



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Crinum x amabile*”

TRABAJO DE TITULACIÓN:

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ANGELO FERNANDO CARRASCO RUIZ

TUTORA: Lcda. KAREN ACOSTA, M.Sc.

Riobamba – Ecuador

2017

© 2017, Angelo Fernando Carrasco Ruiz

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ACETILCOLINESTERASA Y BUTIRILCOLINESTERASA DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES DE *Crinum x amabile*”, de responsabilidad del señor Angelo Fernando Carrasco Ruiz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Lcda. Karen Acosta., M.Sc.

DIRECTORA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Diego Vinueza Tapia., M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Angelo Fernando Carrasco Ruiz declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Angelo Fernando Carrasco Ruiz

Cédula de Identidad: 060391851-7

DERECHOS DE AUTORIA

El trabajo de grado que presento es original y basado en el proceso de investigación y/o adaptación tecnológica establecido en la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. En tal virtud los fundamentos teóricos – científicos son de exclusiva responsabilidad del autor. El patrimonio intelectual le pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Angelo Fernando Carrasco Ruiz

Cédula de Identidad: 060391851-7

DEDICATORIA

A mis padres que gracias a sus consejos, paciencia y apoyo incondicional me han permitido culminar esta etapa de mi vida, con el compromiso de ser un excelente profesional, inspirado por su ejemplo, amor y educación que siempre me han brindado.

Angelo

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen por acompañarme en cada momento, por la fortaleza para superar todos los obstáculos y alcanzar uno de mis sueños de la mano de mi familia.

Le doy gracias a mis padres Angel y Vilma, quienes son el motor de mi vida y mi mayor motivación, por guiarme en cada paso, brindándome su apoyo e inmenso amor.

A mis abuelitos, tías, hermana y a una persona especial quienes con su cariño siempre están presentes en cada etapa, aconsejándome y dispuestos apoyarme en los buenos y malos momentos.

Agradezco profundamente a la Lcda. Karen Acosta M.Sc. y al BQF. Diego Vinueza M.Sc., por haber sido los gestores del presente trabajo de titulación, brindándome su tiempo, consejos y conocimientos, dispuestos siempre a ofrecer su apoyo para afrontar cualquier problema, y sobre todo por su valiosa amistad.

Al Grupo de Investigación de Productos Naturales y Farmacia GIPRONAF por brindarme toda la apertura y poder compartir inolvidables experiencias junto a ellos. De igual manera al Ing. Félix Falconí docente de la Universidad Nacional de Chimborazo, por su valiosa colaboración y aporte en el presente trabajo de titulación.

Quiero agradecer al Dr. Jaume Bastida catedrático del Grupo de Productos Naturales de la Universitat de Barcelona (España), al Dr. Alan Meerow y a la Dra. Nora Oleas investigadora de la Universidad Tecnológica Indoamérica por su importante colaboración durante la realización de este proyecto

GRACIAS

Angelo

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
ACh	Acetilcolina
AChEI	Inhibidor de acetilcolinesterasa
ATC	Yoduro de acetiltiocolina
BTC	Yoduro de butiriltiocolina
DTNB	5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)
PBS	Buffer fosfato salino
L-Phe	L-fenilalanina
L-Tyr	L-tirosina
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	6
1.1.	Antecedentes de la Investigación	6
1.2.	Familia Amaryllidaceae.....	7
1.2.1.	<i>Amaryllidaceae en Ecuador</i>	8
1.2.2.	<i>Alcaloides de Amaryllidaceae</i>	9
1.2.2.1.	<i>Características químicas de los alcaloides de Amaryllidaceae</i>	10
1.2.3.	<i>Crinum x amabile</i>	10
1.3.	Enfermedad de Alzheimer.....	11
1.3.1.	<i>Factores de riesgo</i>	12
1.3.2.	<i>Síntomas</i>	12
1.3.3.	<i>Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer</i>	13
1.3.3.1.	<i>Terapia farmacológica</i>	13
1.3.3.2.	<i>Terapia no farmacológica</i>	14
1.3.4.	<i>Hipótesis colinérgica</i>	14
1.3.5.	<i>Acetilcolinesterasa</i>	16
1.3.5.1.	<i>Inhibidores de la Acetilcolinesterasa</i>	16
1.3.5.2.	<i>Uso de inhibidores de las colinesterasas</i>	16
1.3.6.	<i>Galantamina</i>	17
1.3.7.	<i>Butirilcolinesterasa</i>	18
1.4.	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	18

1.4.1.	<i>Cromatografía de Gases</i>	18
1.4.2.	<i>Espectrometría de Masas</i>	19
1.5.	Métodos para detectar inhibidores de la AChE.....	20
1.5.1.	<i>Método de Ellman</i>	21

CAPÍTULO II

2.	METODOLOGÍA	22
2.1.	Lugar de investigación.....	22
2.2.	Recolección del material vegetal	22
2.3.	Identificación botánica	22
2.4.	Materiales, equipos y reactivos	23
2.4.1.	<i>Materiales</i>	23
2.4.2.	<i>Equipos</i>	24
2.4.3.	<i>Reactivos</i>	25
2.5.	Acondicionamiento del material vegetal	27
2.6.	Extracción de alcaloides	27
2.7.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	29
2.8.	Preparación de soluciones	29
2.8.1.	<i>Muestras de estudio</i>	29
2.9.	Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.	30
2.10.	Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa	31
2.11.	Análisis de datos.....	31
2.11.1.	<i>Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀</i>	32

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS ..	33
----	--	----

3.1.	Obtención del extracto de alcaloides de <i>Crinum x amabile</i>	33
3.2.	Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	34
3.3.	Etapas seguidas en el acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.	38
3.3.1.	<i>Etapas seguidas en el acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.</i>	38
3.3.1.1.	<i>Condición de almacenamiento de soluciones, sustratos, enzimas, estándar y muestras.....</i>	38
3.3.1.2.	<i>Condición del área de trabajo, equipo y tiempos requeridos</i>	39
3.3.2.	<i>Etapas seguidas en el acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.</i>	40
3.3.2.1.	<i>Actividad inhibitoria de galantamina sobre acetilcolinesterasa</i>	40
3.3.2.2.	<i>Actividad inhibitoria de galantamina sobre butirilcolinesterasa</i>	40
3.3.3.	<i>Etapas seguidas en el acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.</i>	41
3.3.3.1.	<i>Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE del extracto de alcaloides de <i>Crinum x amabile</i></i>	41
3.3.3.2.	<i>Evaluación de la actividad inhibitoria de BuChE del extracto de alcaloides de <i>Crinum x amabile</i>.....</i>	42
3.3.4.	<i>Inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de <i>C. amabile</i></i>	43
	CONCLUSIONES.....	46
	RECOMENDACIONES	47
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Factores de riesgo y protección en la Enfermedad de Alzheimer.....	12
Tabla 2-1:	Tipos de ensayo de inhibición de AChE.....	20
Tabla 1-2:	Lista de materiales empleados en los diferentes procesos.....	23
Tabla 2-2:	Lista de equipos empleados en los diferentes procesos.....	24
Tabla 3-2:	Lista de reactivos empleados en los diferentes procesos.....	25
Tabla 4-2:	Diluciones de la muestra de alcaloides de <i>Crinum x amabile</i>	31
Tabla 1-3:	Resultado de la obtención del extracto de alcaloides de <i>C. amabile</i>	33
Tabla 2-3:	Alcaloides identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto purificado del bulbo de <i>Crinum x amabile</i>	34
Tabla 3-3:	Porcentajes de inhibición de AChE del extracto de <i>Crinum x amabile</i>	41
Tabla 4-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto de <i>Crinum x amabile</i> . Prueba 1	42
Tabla 5-3:	Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto de <i>Crinum x amabile</i> . Prueba 2.....	43
Tabla 6-3:	Inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de <i>C. amabile</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Distribución geográfica de la familia botánica Amaryllidaceae.....	8
Figura 2-1:	Tipos de estructuras de los alcaloides de Amaryllidaceae.....	9
Figura 3-1:	Especie vegetal <i>Crinum x amabile</i>	11
Figura 4-1:	Neurotransmisión colinérgica.....	15
Figura 5-1:	Inhibidores de colinesterasas usados para tratar la Enfermedad de Alzheimer.....	17
Figura 6-1	Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa.....	21
Figura 1-2:	Esquema del proceso de extracción de alcaloides del material vegetal de <i>Crinum x amabile</i>	28

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** Recolección del material vegetal, *Crinum x amabile*.
- ANEXO B:** Acondicionamiento del material vegetal.
- ANEXO C:** Obtención del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.
- ANEXO D:** Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.
- ANEXO E:** Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *C. amabile*, para la obtención del IC₅₀. (GRÁFICO 1E, GRÁFICO 2E, GRÁFICO 3E).
- ANEXO F:** Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *C. amabile*, para la obtención del IC₅₀. (GRÁFICO 1F, GRÁFICO 2F, GRÁFICO 3F).

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) del extracto de alcaloides de la especie vegetal *Crinum x amabile*, perteneciente a la familia Amaryllidaceae. A partir del extracto bruto obtenido por maceración en metanol del bulbo seco y triturado, se empleó un protocolo de extracción de alcaloides basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos. El extracto purificado se analizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). La actividad inhibitoria de AChE y BuChE se determinó mediante el método modificado de Ellman, en el cual se establecieron las condiciones necesarias para efectuar el análisis. En total, se identificaron 18 alcaloides de Amaryllidaceae, siendo licorina el más abundante con un porcentaje de 44.01 %, seguido de assoanina con un 11.63 %; además, de la presencia de alcaloides de tipo galantamina; y 3 alcaloides no identificados (m/z 287, m/z 315, m/z 280). Los resultados de inhibición enzimática del extracto de alcaloides se expresaron como valores de IC₅₀, mostrando una actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa significativa (IC₅₀ 2.24 ± 0.01 µg/mL), resultado cercano al compuesto de referencia galantamina (IC₅₀ 0.27 ± 0.03 µg/mL). Por otra parte, se mostró una débil inhibición de butirilcolinesterasa (IC₅₀ 116.59 ± 2.85 µg/mL), observando menos actividad que el compuesto de referencia (IC₅₀ 4.88 ± 0.17 µg/mL); resultado que evidencia una baja selectividad de los alcaloides del extracto hacia esta enzima. Se considera esta especie vegetal como un posible candidato para la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de AChE, con un potencial uso para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer; por ello, se recomienda la realización de más estudios fitoquímicos y farmacológicos de *Crinum x amabile*.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA>, <EXTRACTO DE ALCALOIDES>, <BULBO (*Crinum x amabile*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <COLINESTERASAS>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <ENFERMEDAD DE ALZHEIMER>.

SUMMARY

The present research aimed to determine the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) of the alkaloids extract of the plant species *Crinum x amabile*, belonging to the family Amaryllidaceae. From the crude extract obtained by maceration in methanol of the dried and crushed bulb, it was used an alkaloid extraction protocol based on changes in pH and use of organic solvents. The purified extract was analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The inhibitory activity of AChE and BuChE was determined by the modified method of Ellman, in which the necessary conditions to carry out the analysis were established. In total, 18 alkaloids of Amaryllidaceae were identified, being lycorine the most abundant with a percentage of 44.01%, followed by assoanine with 11.63%; in addition, the presence of galanthamine type alkaloids; and 3 unidentified alkaloids (m/z 287, m/z 315, m/z 280). The enzyme inhibition results of the alkaloid extract were expressed as IC_{50} values, showing a significant acetylcholinesterase inhibitory activity (IC_{50} 2.24 ± 0.01 $\mu\text{g/mL}$), a result close to the reference compound galanthamine (IC_{50} 0.27 ± 0.03 $\mu\text{g mL}$). On the other hand, a weak inhibition of butyrylcholinesterase (IC_{50} 116.59 ± 2.85 $\mu\text{g/mL}$) was showed, observing less activity than the reference compound (IC_{50} 4.88 ± 0.17 $\mu\text{g/mL}$). This result evidences a low selectivity of the alkaloids of the extract towards this enzyme. This plant species is considered as a possible candidate for the search for new selective inhibitors of AChE, with a potential use for the treatment of Alzheimer's disease. For this reason, it is recommended to carry out more phytochemical and pharmacological studies of *Crinum x amabile*.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <ALKALOIDS EXTRACT>, <BULB (*Crinum x amabile*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <CHOLINESTERASES>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <ALZHEIMER'S DISEASE>.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo importante debido a su naturaleza destructiva; el déficit de actividad colinérgica es uno de los principales hallazgos en esta patología y está relacionado con la síntesis de acetilcolina, y las enzimas hidrolizantes acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE); además, ocasiona problemas con la memoria y el comportamiento, con graves repercusiones económicas y sociales. (Ito et al., 2010, p.39).

La inhibición de acetilcolinesterasa, enzima clave en la degradación de acetilcolina, es actualmente la principal estrategia farmacológica disponible para la Enfermedad de Alzheimer. En este sentido, varios alcaloides presentes en fuentes naturales, se han identificado desde hace mucho tiempo como inhibidores de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. (Konrath et al., 2013, p.1701).

La familia Amaryllidaceae está conformada por un grupo de plantas reconocidas por las características farmacológicas que poseen, sobre todo en enfermedades neurodegenerativas (López et al., 2002, p.2521). Durante las últimas tres décadas los estudios de su composición, específicamente de los alcaloides de sus extractos han sido objeto de una activa investigación. (Acosta, 2013, p.3).

Una característica particular de Amaryllidaceae es la presencia, prácticamente, exclusiva de un grupo de alcaloides, que han sido aislados de algunas especies de esta familia, entre ellos se encuentra la galantamina capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y potenciar la función colinérgica central. (Torras-Claveria et al., 2013, p.237).

El género *Crinum* posee alrededor de 130 especies que producen más de 170 compuestos diferentes, de los cuales la mayoría son utilizados tanto en prácticas medicinales como en aplicaciones biomédicas (Fennell y Van Staden, 2001, p.15). Uno de los más interesantes es la galantamina que ha demostrado ser un inhibidor duradero, reversible y competitivo de la enzima acetilcolinesterasa, produciendo una amplia gama de importantes efectos fisiológicos. (Torras-Claveria et al., 2013, p.237).

El análisis de extractos vegetales mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), se ha aplicado con éxito para la identificación fiable y rápida de los alcaloides de Amaryllidaceae. (Berkov et al., 2008, p.411).

El método colorimétrico propuesto por Ellman y colaboradores (1961, p.88), permite determinar la actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE, la cual se establece mediante el incremento de color producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la acetilcolina, cuando ésta reacciona con el ión ditiobisnitrobenzoato para formar el anión del ácido tionitrobenzónico que es de color amarillo.

Por lo antes mencionado, a pesar del creciente avance en el campo de la síntesis orgánica, aún existen fármacos obtenidos directamente a partir de material vegetal, lo que resulta en la búsqueda de nuevos inhibidores generados a través de fuentes renovables para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Planteamiento del Problema

La familia botánica Amaryllidaceae se distribuye a través de regiones tropicales y subtropicales del globo y son prominentes en América del Sur. El valor medicinal de estas plantas se debe a la aplicación de galantamina, un activo aprobado y comercializado como estrategia para el tratamiento paliativo de la Enfermedad de Alzheimer. (Cortes et al., 2015, p.42).

La Enfermedad de Alzheimer se identificó por primera vez hace más de 100 años, pero pasaron 70 años antes de que fuera reconocida como la causa más común de demencia. Se caracteriza por una disminución de la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades cognitivas, que afectan la capacidad de una persona para realizar actividades cotidianas. (Alzheimer's Association, 2015, p.333).

Los hallazgos de esta enfermedad indican que el riesgo de demencia en una persona en cualquier edad puede estar disminuyendo ligeramente; sin embargo, teniendo en cuenta el envejecimiento acelerado de la sociedad humana, la carga social y el aumento de la esperanza de vida en todo el mundo, se

prevé que las tasas de EA crezcan enormemente, especialmente en las regiones en desarrollo. (Alzheimer's Association, 2015, pp.342-343).

Alrededor de 4,6 millones de nuevos casos se suman cada año en todo el mundo y la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que hasta el año 2016 existieron cerca de 47,5 millones de personas que padecen enfermedades neurodegenerativas. Entre el 60% y 70% de estos casos presentan Alzheimer. La entidad anuncia que el número de personas con esta patología en el mundo pase de 75.6 millones en 2030 a 135.5 millones en 2050. (Organización Mundial de la Salud, 2016).

La fundación Trascender con Amor, Servicio y Excelencia (TASE) junto con otros organismos que trabajan con adultos mayores, calculan que en el Ecuador existen más de 100 mil pacientes con esta enfermedad, debido a esto plantearon a la Comisión del Derecho a la Salud que se incorpore un capítulo sobre “Alzhéimer y otras Demencias” en el Código Orgánico de Salud; en donde se garantice los protocolos suficientes para la evaluación, diagnóstico temprano y tratamientos para quienes la padecen. (Asamblea Nacional del Ecuador, 2014).

La investigación científica es una de las principales actividades del Bioquímico Farmacéutico en el ámbito del desempeño profesional, con el presente trabajo se podrá obtener información acerca de la familia de plantas Amaryllidaceae, al determinar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides en enzimas con relevancia en enfermedades neurodegenerativas, que afectan a gran parte de la población.

Justificación de la Investigación

La tendencia actual en el mundo es llevar a cabo estudios que sean de utilidad pública, más aún cuando se trata de fuentes biológicas que puedan brindar un gran aporte a la sociedad. Sin embargo, en nuestro país no se han realizado investigaciones de actividad farmacológica de la familia Amaryllidaceae, por lo que el conocimiento en este campo es escaso.

Los alcaloides de Amaryllidaceae son de tipo isoquinolínico, los cuales poseen una elevada afinidad al sistema nervioso central, exclusivo de este tipo de plantas. Por lo tanto, es necesario conocer el potencial químico y farmacológico de estas especies para diseñar planes a través de la investigación que aseguren su persistencia y uso a largo plazo. (National Institute on Aging, 2016).

La especie vegetal *Crinum x amabile* pertenece a esta familia, en el Ecuador no se han reportado estudios de la actividad que ejercen estas plantas y como tal se presenta el interés de determinar la capacidad de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, debido a su importancia en la Enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo al Plan Nacional del Buen Vivir, se debe mejorar la calidad de vida de la población, en donde se incluye la prevención de enfermedades y fortalecimiento de las capacidades de las personas, para reforzar su salud. Además, de fomentar la investigación científica sobre el uso de los recursos genéticos y biodiversidad de nuestro país. (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013, pp.137-232).

Dentro de las “Prioridades de investigación en salud 2013-2017”, el Ministerio de Salud Pública, estableció una línea dedicada a enfermedades neurológicas, siendo una sublínea la Enfermedad de Alzheimer, donde se plantea la optimización de recursos para realizar estudios e impactar positivamente en la calidad de los mismos, logrando de esta manera coordinar los esfuerzos de todos los actores del sistema de salud, para alcanzar los objetivos del Plan del Buen Vivir. (Ministerio de Salud Pública, 2013, p.1).

Este trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa exhibida por el extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*, especie localizada en la Costa ecuatoriana, en el cantón Muisne ubicado al oeste de la Provincia de Esmeraldas; para de esta manera contribuir a la investigación en nuestro país y a posibles soluciones de salud en beneficio de la sociedad.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto bruto de alcaloides a partir de los bulbos de la especie *Crinum x amabile*, mediante un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos.
- Identificar los alcaloides que contiene el extracto obtenido, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Adaptar el método modificado de Ellman et al, a las condiciones experimentales del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo, para el estudio de inhibición enzimática.
- Comparar la actividad inhibitoria del extracto de alcaloides totales de *Crinum x amabile* sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, utilizando como compuesto de referencia galantamina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la Investigación

Las plantas de la familia Amaryllidaceae son bien conocidas por su valor ornamental, pero también por los alcaloides que producen. La licorina fue el primer alcaloide de Amaryllidaceae aislado a partir de *Narcissus pseudonarcissus* en 1877, desde entonces se han producido enormes avances en el estudio de estas plantas, habiendo aún muchas fuentes fitoquímicas sin explorar. (Schmeda-Hirschmann et al., 2000, p.309). Hasta ahora, se conocen alrededor de unos 300 alcaloides de Amaryllidaceae con estructuras que varían notablemente entre sí, pero se consideran que están relacionados biogenéticamente. (Bastida, Lavilla y Viladomat, 2006, p.87).

Los estudios de estos compuestos están relacionados directamente con la Enfermedad de Alzheimer, en el año 1976 en Londres, Davies y Maloney descubrieron la falta del neurotransmisor acetilcolina en los cerebros de estos pacientes (Davies, 1976, p.1403), y también se dio a conocer la "hipótesis hipocolinérgica" caracterizada por una marcada disminución de la acetilcolina y degeneración de los circuitos neuronales (Alpízar y Morales, 2003, p.51).

El apoyo científico con respecto a esta hipótesis se correlaciona con la capacidad de los fármacos para restaurar la función colinérgica, mejorar la cognición y atenuar algunos efectos de comportamiento asociados a la enfermedad. De hecho, el conocimiento sobre la evolución y la patología molecular ha demostrado que el uso de inhibidores de acetilcolinesterasa debe ser el enfoque más eficaz para tratar la EA. (Viegas et al., 2005, p.916).

En el estudio realizado por López et al. (2002, p.2521), se probaron 23 alcaloides puros de Amaryllidaceae y 26 extractos de diferentes especies del género *Narcissus* por su actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, utilizando galantamina como referencia. Todos los extractos con la mayor

actividad de inhibición de acetilcolinesterasa contenían galantamina, excepto la de *N. assoanus*, una especie portadora de alcaloides del tipo licorina.

El alcaloide galantamina se obtuvo por primera vez en 1952 del bulbo de *Galanthus woronowii*, utilizado para revertir los efectos de los anestésicos generales. Posteriormente, se describió su actividad anticolinesterásica y se encontró en diversas especies de narcisos pertenecientes a la familia de las Amaryllidaceae, en especial de *Galanthus nivalis* empleado para extracción industrial (Viegas et al., 2005, p.918). La galantamina fue probada en la Enfermedad de Alzheimer en 1989 y desde entonces los ensayos clínicos culminaron con la comercialización del fármaco con el nombre de Reminyl®, cuyos efectos terapéuticos permanecen incluso después del final del tratamiento. (García, 2012, p.157).

Por medio del método propuesto por Ellman et al, se han detectado extractos de plantas que tienen la capacidad de inhibición de la enzima AChE; por ejemplo, Torras-Claveria et al. (2013, p.237) evaluaron la actividad inhibitoria de más de 100 plantas del género *Narcissus*, en donde la galantamina fue encontrada en 97 plantas y sanguinina en 22 de estas. La sanguinina es un inhibidor de la AChE más potente que la galantamina.

En la investigación realizada por Pham et al. (1998, p.371), señala que la especie *Crinum x amabile* (Amaryllidaceae) de origen asiático, no es sólo una planta decorativa, sino que también se ha utilizado durante mucho tiempo en la medicina popular vietnamita como un emético, como un remedio para el reumatismo y dolor de oído. En el estudio se informó el aislamiento de siete alcaloides de bulbos secos de *C. amabile*, entre ellos: licorina, bufanisina y augustina, además se aislaron por primera vez ambelina, flexinina y dos nuevos alcaloides crinamabina y 4a-dehidroxicrinamabina. Sus estructuras se establecieron a partir de pruebas espectroscópicas.

1.2. Familia Amaryllidaceae

Amaryllidaceae es una familia de plantas monocotiledóneas, conocidas por su atractivo hortícola y ornamental, se caracterizan por ser herbáceas, perennes, con flores muy atractivas y la mayoría

presentan bulbos. Existen aproximadamente 85 géneros y 1100 especies, que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo, particularmente en África, América del Sur, en la región andina y el Mediterráneo. (Fan-Chiang et al., 2016, p.5640).

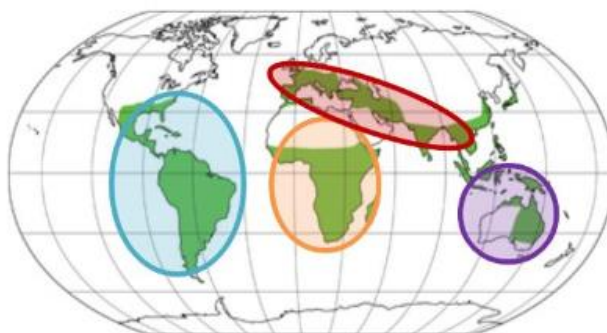


Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia botánica Amaryllidaceae

Fuente: (Acosta, 2013, p.1).

Los alcaloides que constituyen este tipo de plantas poseen interesantes actividades biológicas y frecuentemente usos etnobotánicos. Estos compuestos resultan del metabolismo de los aminoácidos tirosina y fenilalanina, ambos dan lugar al precursor base de todos los alcaloides de Amarilidáceas, la norbelladina. (Paulo De Andrade, 2014, p.7).

1.2.1. Amaryllidaceae en Ecuador

Nuestro país es un importante centro de diversidad de la familia Amaryllidaceae, estas plantas se encuentran distribuidas entre los 0 y 4000 metros de altitud, en hábitats diferentes como bosques andinos, valles secos interandinos y bosques del litoral seco y húmedo. La mayoría de las especies son endémicas y están sometidas a alguna amenaza debido a su distribución restringida y hábitat donde se producen, por lo que su explotación debería ser controlada. (Minga et al., 2015, p.50).

En el Ecuador existen 36 especies de plantas de la familia Amaryllidaceae, entre las más conocidas se encuentran: *Phaedranassa dubia*, *P. cinérea*, *P. cuencana*, *P. schizantha*, *P. brevifolia*, *P. tunguraguae*, *P. glauciflora*, *P. viridiflora*, *Eucrosia aurantiaca*, *Eucharis grandiflora*, *Eucharis moorei*, *Eucharis formosa*, *Eucharis candida*, *Stenomesson aurantiacum*, *Hippeastrum puniceum* y *Crinum amabile*. (Meerow et al., 2015, p.1).

1.2.2. Alcaloides de Amaryllidaceae

Los alcaloides de Amaryllidaceae poseen a menudo actividades farmacéuticas significativas, incluyendo antiviral, antifúngica, antitumoral, citotóxica y antiinflamatoria. Estudios recientes también han informado que algunos derivados podrían ser usados para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. (Fan-Chian et al., 2016, p.5640).

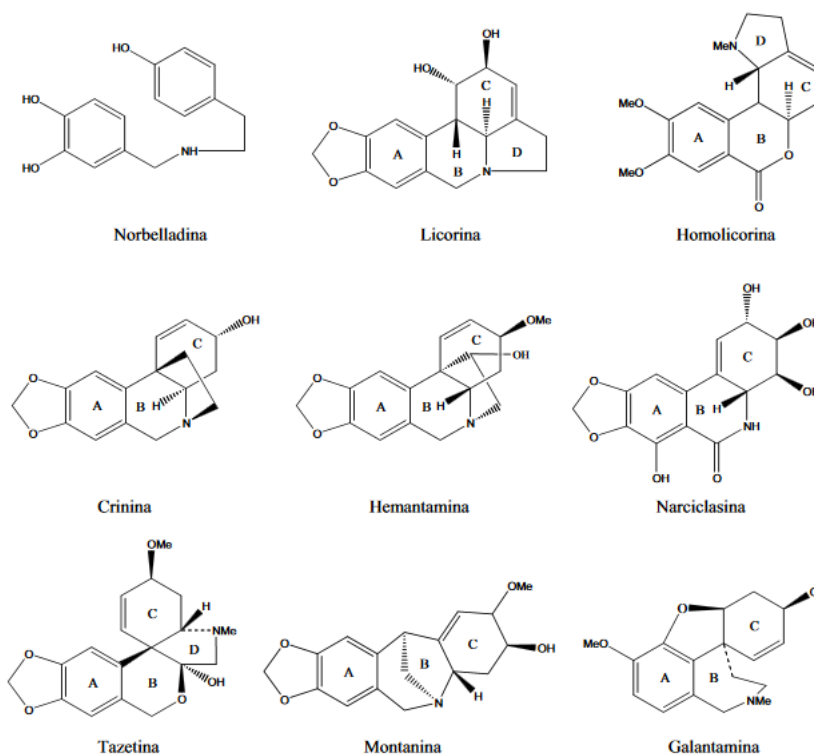


Figura 2-1: Tipos de estructuras de los alcaloides de Amaryllidaceae.

Fuente: (Osorio, 2008, p.8).

Dicha familia presenta nueve tipos de estructuras en base al sistema heterocíclico (Figura 2-1): galantamina, montanina, tazetina, narciclisina, hemantamina, crinina, licorina, homolicorina y norbelladina. (Osorio, 2008, p.8).

1.2.2.1. Características químicas de los alcaloides de Amaryllidaceae

Las características químicas más importantes de los alcaloides de esta familia de plantas son (Bastida y Viladomat, 2002, p.141):

1. Su estructura base es C₆-C₁-N-C₂-C₆. La parte C₆-C₁ proviene del aminoácido L-Phe, mientras que la fracción N-C₂-C₆ proviene de L-Tyr.
2. Son bases ligeramente débiles, con pK_a entre 6 y 9.
3. Poseen un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario e, incluso, cuaternario y por lo general el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20 de acuerdo a los sustituyentes del sistema cíclico.

Los alcaloides de Amaryllidaceae tienen un cierto grado de similitud, conteniendo generalmente un grupo arilo o-dioxigenado (por ejemplo, benzodioxol) con anillos heterocíclicos fusionados en él (Bastida y Viladomat, 2002, p.141). Esta semejanza química permite que las estructuras complicadas sean obtenidas a través de una serie de semisíntesis de una forma más simple. (Fan-Chian et al., 2016, p.5640).

1.2.3. *Crinum x amabile*

El género *Crinum* representa un importante sector en la familia Amaryllidaceae con amplia distribución geográfica en regiones cálidas y templadas del mundo. El nombre *Crinum* se origina del griego Krinon, que significa "lirio" y *amabile* del epíteto latino "digno de amor". (Meerow y Snijman, 1998, p.83).

Crinum x amabile fue descrita por Donn y Ker Gawl y publicado en *Hortus Cantabrigiensis* (1985, p.83), como especies vegetales herbáceas perennes, formadas de bulbos gruesos con una longitud de hasta 15 cm, con hojas largas, arrosietadas y planas. Sus flores son de color rosado o blanco, intensamente vistosas, actinomorfas y hermafroditas.



Figura 3-1: Especie vegetal *Crinum x amabile*.

Realizado por: Angelo Carrasco. 2017.

Esta especie vegetal es usada para dolores abdominales y contusiones en el cuerpo, colocando las hojas y bulbos en el fuego y luego en el sitio afectado durante un largo periodo de tiempo, las flores son usadas para tratar los resfriados, y también los alcaloides de sus extractos pueden tener un efecto inhibidor de la acetilcolinesterasa. (De La Torre et al., 2008, p.160).

1.3. Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurológico que conlleva a la muerte de las células nerviosas del cerebro, generalmente diagnosticada en individuos mayores de 65 años. Sus principales características patológicas son: la acumulación de placas amiloides, o placas seniles, que contienen depósitos extracelulares de péptido β -amiloide y la presencia de enredos neurofibrilares intraneuronales, que resultan de la proteína τ hiperfosforilada. (Restrepo, 2012, p.63).

El síntoma inicial más común de la EA es el deterioro de la memoria reciente con preservación de la memoria a largo plazo, lo que conduce a una disfunción cognitiva progresiva. (Konrath et al., 2013, p.1701).

1.3.1. Factores de riesgo

El factor de riesgo predominante de la Enfermedad de Alzheimer es la edad, además de múltiples factores que actúan simultáneamente y en algunos casos como factores de protección. (Romano et al., 2007, p.10).

Otros factores:

- Presión arterial alta por un largo periodo de tiempo, niveles elevados de homocisteína, antecedentes de traumatismo craneal, pertenecer al género femenino debido a un déficit de estrógenos en edades avanzadas, deficiencia de folatos y vitamina B₁₂.
- Factores de protección: estilo de vida saludable, alto nivel de escolarización, control de enfermedades cerebro vasculares y mejores cuidados sociosanitarios. (Villar et al., 2004, p.28).

Tabla 1-1: Factores de riesgo y protección en la Enfermedad de Alzheimer.

FACTORES DE RIESGO	FACTORES PROTECTORES
Edad	Alto nivel educacional
Sexo femenino	Habilidades lingüísticas
Alelo ApoE4/ApoE4	Actitud positiva
Mutaciones cromosómicas	Tratamiento prolongado con AINEs
Historia familiar	Tratamiento prolongado con estrógenos en mujeres menopáusicas
Bajo nivel educacional	Tratamiento con IECA
Factores de riesgo vascular	
Factores ambientales	

Realizado por: Angelo Carrasco. 2017.

Fuente: (Otero y Scheitler, 2003, p.7).

1.3.2. Síntomas

Los síntomas de la Enfermedad de Alzheimer varían entre los individuos. El síntoma inicial más común es un deterioro gradual de la capacidad de recordar nueva información, además los pacientes atraviesan por diferentes fases:

- Leve: dificultad para recordar eventos recientes, modificar la localización de objetos, desorientación en lugares conocidos, desafíos en la planificación o resolución de problemas.
- Moderada: pérdida de memoria que interrumpe la vida cotidiana, confusión con el tiempo o el lugar, cambios en el estado de ánimo y la personalidad, incluso problemas con las palabras al hablar o escribir.
- Grave: puede llegar a producirse la pérdida total en la capacidad del habla y en algunos casos una dependencia absoluta de otras personas para realizar cualquier actividad. (Alzheimer's Association, 2015, p.335).

1.3.3. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

No existe cura para esta patología, los tratamientos están enfocados a disminuir el progreso de la enfermedad, manejar los problemas de confusión, agitación y de comportamiento, modificación del ambiente del hogar y apoyo a los miembros de la familia u otras personas que brindan cuidados al paciente. (Romano et al., 2007, p.11).

1.3.3.1. Terapia farmacológica

Los tratamientos farmacológicos emplean medicamentos para retardar, detener o tratar los síntomas de una enfermedad. Tres fármacos han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), que mejoran temporalmente los síntomas de la Enfermedad de Alzheimer al aumentar la cantidad de neurotransmisores en el cerebro. (Alzheimer's Association, 2015, pp.337-338).

La eficacia de estos medicamentos varía de persona a persona. Sin embargo, ninguno de los tratamientos disponibles hoy en día retarda o detiene el daño a las neuronas que causa los síntomas de EA y, finalmente, hace a la enfermedad mortal. (Alzheimer's Association, 2015, pp.337-338).

Los fármacos anticolinesterásicos tienen un efecto inhibitorio de las enzimas encargadas de descomponer la acetilcolina, se ha probado la eficacia de esos medicamentos en la memoria y otras funciones cognitivas; como consecuencia, el comportamiento del paciente en cuanto a la iniciativa, alucinaciones, apatía y la capacidad funcional han mejorado sustancialmente. (Romano et al., 2007, p.11).

1.3.3.2. Terapia no farmacológica

Las terapias no farmacológicas son aquellas que emplean enfoques distintos de la medicación, como la musicoterapia y la terapia de reminiscencia (terapia en la que se pueden utilizar fotos y otros artículos familiares para fortalecer la memoria). Al igual que con las terapias farmacológicas actuales, no se ha demostrado que las terapias no farmacológicas alteren el curso de la Enfermedad de Alzheimer. Las terapias no farmacológicas se usan a menudo con el objetivo de mantener o mejorar la función cognitiva, la capacidad de realizar actividades de la vida diaria o la calidad de vida en general. (Alzheimer's Association, 2015, p.335)

Las revisiones sistemáticas sobre terapias no farmacológicas han demostrado que algunos, como el ejercicio y la actividad cognitiva (por ejemplo, jardinería, juegos de palabras, escuchar música y cocinar) son prometedores. (Alzheimer's Association, 2015, p.336)

1.3.4. Hipótesis colinérgica

Existen pruebas considerables que sugieren una posible asociación entre los déficits de memoria descritos en pacientes con EA y el deterioro cognitivo en el sistema nervioso central (SNC), esta teoría se basó en el hallazgo de que una pérdida de actividad colinérgica se observa comúnmente en los cerebros de personas con la Enfermedad de Alzheimer. (Craig et al., 2011, p.1398).

Por lo tanto, esta hipótesis postula que la restauración de la neurotransmisión colinérgica es una estrategia útil para aumentar la disponibilidad de acetilcolina sináptica y mejorar la memoria en este tipo de pacientes. (Schliebs y Arendt, 2006, p.1626).

La conceptualización de la EA como síndrome de deficiencia colinérgica proporciona un esquema favorable para la búsqueda de nuevos fármacos, pero también es importante entender que el déficit colinérgico no es la única disfunción neurotransmisora observada en la enfermedad, ya que los sistemas catecolaminérgicos, glutamatérgicos y serotoninérgicos también están involucrados. (Francis et al., 2010, p.221).

La acetilcolina liberada en la hendidura sináptica es rápidamente hidrolizada por la AChE, y el bloqueo de este proceso catabólico resulta en niveles aumentados del neurotransmisor, que puede corregir parcialmente la deficiencia colinérgica observada en la EA. La BuChE, o pseudocolinesterasa, desempeña un papel secundario en la regulación de los niveles de acetilcolina en comparación con la AChE, pero posee un papel importante en la patología de la EA, ya que ambas enzimas están presentes en el cerebro y se detectan entre enredos neurofibrilares intraneuronales (NFT) y placas amiloides. (Beard et al., 1995, p.75).

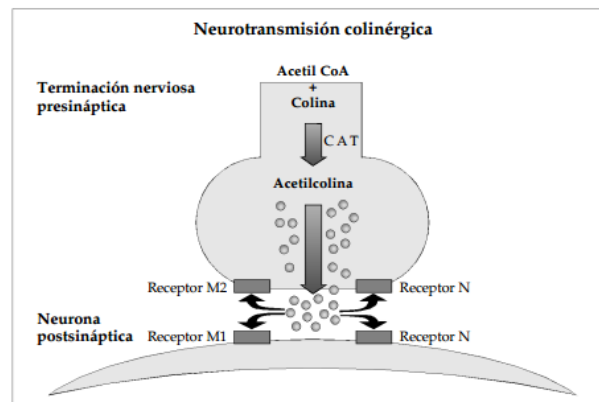


Figura 4-1: Neurotransmisión colinérgica.

Fuente: (García, 2012, p.13).

Por otra parte, en los pacientes con EA, el nivel de actividad de AChE tiende a disminuir y la actividad de BuChE aumenta. En la etapa tardía, BuChE representa la colinesterasa predominante en el cerebro,

y por esta razón esta enzima también se apunta como un enfoque para interceder la enfermedad. (Greig et al., 2002, p.77).

1.3.5. Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima del grupo de las hidrolasas (EC. 3.1.1.7), que está presente en los seres humanos. Se localiza en los músculos y el sistema nervioso, y es la encargada de la regulación de la concentración de acetilcolina (ACh), un neurotransmisor implicado en la sinapsis colinérgica, que permite la transmisión de la señal nerviosa en los sistemas central y periférico. La actividad relativamente alta de AChE también puede encontrarse en las células sanguíneas responsables de la degradación de la acetilcolina plasmática. (Pohanka, 2011, p.220).

1.3.5.1. Inhibidores de la Acetilcolinesterasa

Los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEI) incluyen una gran cantidad de compuestos con estructuras muy variadas que alteran la sinapsis colinérgica, debido a la inhibición de acetilcolinesterasa. Estos compuestos se relacionan de diferentes maneras, y en función de ellos se distinguen tres grupos: compuestos que interactúan con el sitio activo, compuestos que interactúan con la cavidad aromática y aquellos que interactúan con el subsitio periférico aniónico. (Pohanka, 2011, p.222).

1.3.5.2. Uso de inhibidores de las colinesterasas

Varios derivados naturales, sintéticos y semisintéticos han sido descubiertos o diseñados para la Enfermedad de Alzheimer. El enfoque de tratamiento actualmente aprobado para este trastorno se centra en la terapia de reemplazo para déficit de neurotransmisión colinérgica central, con resultados alentadores obtenidos con el uso de anticolinesterásicos para amplificar la acción fisiológica de la acetilcolina, mejorando de esta manera los estímulos musculares y procesos cognitivos en los pacientes. Tres fármacos que se dirigen al sistema colinérgico están actualmente aceptados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA): donepezil, rivastigmina y galantamina.

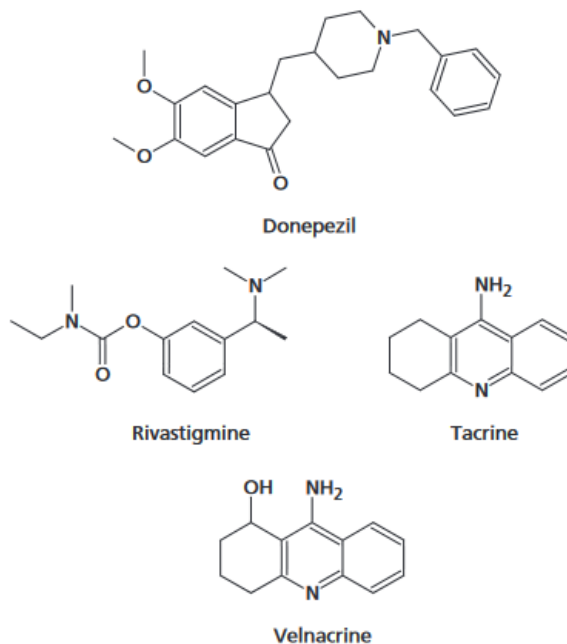


Figura 5-1: Inhibidores de colinesterasas usados para tratar la Enfermedad de Alzheimer.

Fuente: (Konrath et al., 2013, p.1703).

1.3.6. Galantamina

Desde el punto de vista farmacológico, la galantamina es uno de los alcaloides terciarios más importantes, se puede obtener de diversas especies de la familia Amaryllidaceae incluyendo bulbos y flores. Se origina de un acoplamiento fenol oxidativo y posee una estructura base dibenzofurano. (Konrath et al., 2013, p.1704).

La galantamina se emplea en la mejora de la transmisión colinérgica por modulación alostérica de los receptores nicotínicos y se utiliza en el tratamiento de los síntomas de EA y otras formas de demencia, también en enfermedades neuromusculares o para antagonizar la depresión respiratoria inducida por fármacos. (Konrath et al., 2013, p.1704).

Este producto se comercializó por primera vez en 2001 y es un inhibidor de AChE relativamente selectivo de acción prolongada, con menos actividad inhibidora de BuChE, aunque se han descrito algunos efectos secundarios gastrointestinales. (Bores et al., 1996, p.728).

1.3.7. *Butirilcolinesterasa*

La butirilcolinesterasa es una enzima estructural y funcionalmente relacionada con la AChE, es sintetizada en el hígado y tiene la función de hidrolizar algunos ésteres de colina. BuChE es abundante en los ganglios autónomos, las glándulas exocrinas, el músculo liso, en las células gliales y satélites del SNC, algunos órganos y el plasma; la concentración de esta enzima en las neuronas colinérgicas generalmente es baja, sin embargo, se mantiene la hipótesis de que actúa como protector de la acetilcolinesterasa, impidiendo la inhibición de la misma. (Sanchez et al., 2011, p.247).

1.4. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

En el aislamiento e identificación de alcaloides se emplean diferentes métodos, entre los más eficaces tenemos la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), que permiten una adecuada separación de muestras complejas y detección de los componentes a través de los índices de retención y los espectros de masas. Ambas técnicas muestran una alta sensibilidad, con un costo relativamente bajo, junto a una alta resolución. (Baquero, 2006, p.20).

1.4.1. *Cromatografía de Gases*

La Cromatografía de Gases (CG) inicialmente fue creada para determinar los compuestos volátiles que se propagan al calentar una sustancia, además provee información cuantitativa y cualitativa de los componentes presentes en ella, sin embargo, actualmente se utiliza para análisis de mezclas complejas de hidrocarburos, productos vegetales, pesticidas, productos alimenticios, aceites esenciales e, inclusive, como parte de ciencias forenses. (Baquero, 2006, p.21).

Las muestras empleadas en esta técnica deben ser volátiles y termoresistente, para luego ser inyectadas en una columna cromatográfica. La elución se produce generalmente por los gases de tipo inerte tales como nitrógeno, helio e hidrógeno molecular. (Baquero, 2006, p.21).

El éxito de aplicar esta técnica depende de la columna que se use y del análisis que se va a realizar, también se debe tener en cuenta los cilindros, la fase estacionaria, las trampas de gases y la adecuada aplicación de los detectores. (Olguín y Rodríguez, 2004, p.6).

1.4.2. Espectrometría de Masas

La Espectrometría de Masas (EM) es una importante técnica analítica, empleada para identificar compuestos desconocidos (estructura) o para cuantificar compuestos conocidos (concentración o masa molecular), previamente convertidos en iones. Generalmente, las moléculas de interés forman parte de una mezcla heterogénea que requieren separación, para ello deben someterse a una fuente de ionización adquiriendo carga positiva o negativa. (Cocho de Juan, 2007, p.27).

El espectro de masas de cada compuesto es único y resulta de la fragmentación del analito y de los iones residuales gracias al impacto electrónico, y puede ser usado como una huella química para caracterizar a los componentes. En definitiva, la EM se basa en la separación de partículas atómicas o moleculares en función de su relación masa-carga (m/z); este proceso comprende cuatro fases (Cocho de Juan, 2007, p.27):

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su m/z .
- Detección de los iones y producción de la señal eléctrica correspondiente.

1.5. Métodos para detectar inhibidores de la AChE

Para determinar el potencial de inhibición de AChE de un compuesto o extracto, varios métodos han sido descritos (Tabla 2-1), los mismos se fundamentan en la capacidad de la acetilcolinesterasa de hidrolizar la acetilcolina, en acetato y colina; al igual que sustratos similares al neurotransmisor. Los productos de la hidrólisis pueden ser identificados directamente o revelados a través de la formación de complejos fluorescentes o coloreados. Esta técnica se ha podido adaptar a la cromatografía en capa fina o a métodos colorimétricos en microplacas de 96 pozos, por lo tanto, son ensayos fáciles de realizar, sensibles y apropiados en estudios de productos naturales. (Castellanos, 2014, p.21).

Tabla 2-1: Tipos de ensayo de inhibición de AChE.

TIPO DE ENSAYO	DESCRIPCIÓN
Método colorimétrico usando Ácido Ditiobis-nitrobenzoico (DTNB) y acetiltiocolina	Formación de un compuesto de color amarillo, donde la inhibición se observa como manchas de color blanco o disminución del color amarillo
Método colorimétrico usando acetato de 1-naftilo y Fast Blue Salt (FBS)	Formación de un compuesto coloreado (púrpura) por la reacción entre el naftol, producto de hidrólisis del acetato de 1-naftilo, y el compuesto azoico FBS. Las manchas de inhibición son blancas.
Método Químico luminiscente implementando en técnicas HTS	Reacciones enzimáticas acopladas para producir quimioluminiscencia, determinada por la emisión de luz producida por el luminol y la peroxidasa utilizada.
Método colorimétrico usando $K_3(FeCN)_6$ y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Formación de un complejo coloreado azul en presencia de sales de hierro. La inhibición de la enzima se observa como manchas amarillas claras.

Realizado por: Angelo Carrasco. 2017.

Fuente: (Castellanos, 2014, p.22).

1.5.1. Método de Ellman

De acuerdo al método espectrofotométrico propuesto por Ellman et al. (1961, p.89), la AChE hidroliza la acetiltiocolina originando tiocolina y acetato. Esto se consigue mediante la reacción continua del tior con el 5-tio-2-nitrobenzoato, para producir el anión amarillo del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). La tasa de producción de color se mide a través del espectrofotómetro de UV-VIS a una $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Este método es el más empleado, porque es extremadamente sensible y es aplicable a concentraciones bajas de enzima, además el espectrofotómetro UV-VIS presenta una mayor disponibilidad en muchos laboratorios, es de fácil manejo y permite un análisis rápido. (Ellman et al., 1961, p.88).

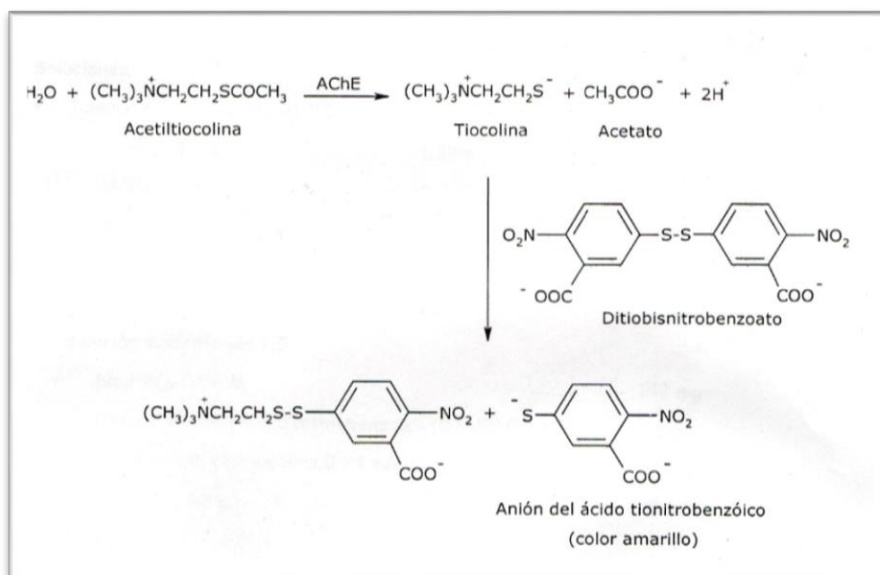


Figura 6-1: Esquema de la reacción enzimática en que se basa el método colorimétrico para determinar la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa.

Fuente: (Ellman et al., 1961, p.89).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Chimborazo. Además, se contó con la colaboración de la Universitat de Barcelona (España) para la realización del estudio.

2.2. Recolección del material vegetal

La especie vegetal *Crinum x amabile* se recolectó alrededor de la playa del cantón Muisne, zona ubicada al oeste de la provincia de Esmeraldas-Ecuador, la planta se encontraba en estado de floración durante el mes de febrero de 2017. El punto de recolección fue:

- Latitud: 0,6021
- Longitud: -80,0260
- Altitud: 100 msnm

2.3. Identificación botánica

La identificación botánica de la especie *Crinum x amabile* fue realizada por el Dr. Alan Meerow, botánico del *Fairchild Tropic Botanical Garden* (Miami, EU).

2.4. Materiales, equipos y reactivos

2.4.1. *Materiales*

Tabla 1-2: Lista de materiales empleados en los diferentes procesos.

MATERIAL	CANTIDAD	MATERIAL	CANTIDAD
PREPARACIÓN DE REACTIVOS			
Balones de aforo 100 mL	2	Espátula	1
Pipeta graduada 5 mL	1	Microespátula	1
Pipetas graduadas 1 mL	2	Frascos plásticos tipo viales 5 mL	3
Pipeta volumétrica 10 mL	1	Frascos ámbar de vidrio 500 mL	6
Probeta 100 mL	1	Frasco ámbar de vidrio 1000 mL	1
Balones de aforo de 1 L	2	Piseta	1
EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES			
Frasco ámbar de vidrio 1000 mL	1	Probeta 10 mL	1
Probeta 50 mL	1	Embudo de separación 500 mL	1
Papel filtro	1	Vaso de precipitación 500 mL	3
Embudo	1	Balón para rotavapor	1
Trípode	1	Frasco de vidrio tipo vial 10 mL	1
Vasos de precipitación 250 mL	3	Desecador	1

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA AChE Y BuChE			
Tubos Eppendorf 1,5 mL	150	Caja térmica de Poliestireno expandido 4 L	1
Tubos Eppendorf 0,5 mL	150	Caja térmica de Poliestireno expandido 19 L	1
Tubos plásticos graduados con tapón de rosca 35 mL	2	Gradillas para tubos	2
Puntas amarillas para micropipeta	300	Cajas porta-tubos	3
Puntas azules para micropipeta	300	Toallas de papel tipo <i>tissue</i> (caja)	1
Puntas blancas para pipeta multicanal	200	Toallas de papel toalla (rollo)	1
Microplacas de 96 pocillos	3	Papel aluminio (rollo)	1
Dispensador de líquido para pipeta multicanal	1	Bloques de hielo reutilizables	6

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

2.4.2. Equipos

Tabla 2-2: Lista de equipos empleados en los diferentes procesos.

EQUIPO	PROCEDIMIENTO
Estufa de secado RedLine by Binder	Secado de droga vegetal
	Reducción de volumen de extracto de alcaloides
Molino Arthur H. Thomas C.O	Reducción de tamaño de droga seca
Balanza analítica OHAUS EXPLORER	Pesajes en varios procedimientos

Agitador magnético	Preparación de reactivos
Refrigerador	Conservación de reactivos y muestras
Congelador (-20°C)	Conservación de reactivos y solución madre de alcaloides
Congelador (-14°C)	Conservación de soluciones
Baño Ultrasonido	Obtención de extracto bruto
Rotavapor	Concentración de extractos
pH-metro	Extracción de alcaloides
Espectrofotómetro Elisa BioTek ELx800	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cabina de flujo laminar vertical BIOBASE	Preparación de ensayos de determinación actividad inhibitoria de colinesterasas
Agitador de tubos	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Agitador para microplacas	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cronómetro	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas	Identificación de alcaloides

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

2.4.3. *Reactivos*

Tabla 3-2: Lista de reactivos empleados en los diferentes procesos

REACTIVO	ENSAYO
Metanol CH ₄ O	Obtención de extracto bruto
Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄ (2% V/V)	
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ O	

Hidróxido de amonio NH_4OH (25% V/V)	Extracción de alcaloides
Acetato de etilo $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	
Sulfato de sodio anhidro Na_2SO_4	
Goma arábica	
Fosfato dipotásico K_2HPO_4	Determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas
Bifosfato de Sodio NaH_2PO_4	
Cloruro de Sodio NaCl	
Fosfato de disódico Na_2HPO_4	
Ácido clorhídrico HCl (0.5 N)	
Acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i> (<i>electric eel</i>) (SIGMA)	
Butirilcolinesterasa de suero equino (SIGMA)	
Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (SIGMA)	
Yoduro de acetiltiocolina (SIGMA)	
Yoduro de butiriltiocolina (SIGMA)	
Estándar galantamina	
Agua destilada	Preparación de reactivos y lavado de materiales
Agua grado farmacéutico	

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

2.5. Acondicionamiento del material vegetal

Después de la recolección del material vegetal se procedió a su limpieza con paños húmedos de agua destilada, para eliminar cualquier tipo de impurezas presentes en la planta. Posteriormente, los bulbos se cortaron, separándolos en finas capas de 4 cm aproximadamente y se dejaron secar a una temperatura de 65°C durante 72 horas. Una vez secos, se trituraron en un molino de cuchilla giratoria Arthur H. Thomas C.O, obteniendo partículas menores a 5 mm. El material resultante se pesó y se registró. Se obtuvo un peso final de 151.58 g de bulbo seco.

2.6. Extracción de alcaloides

Una vez seca y triturada la planta se pesaron 16 g de bulbo para ser macerados añadiendo 800 mL de metanol, dejando en reposo durante 72 horas y alternando con baños de ultrasonido de 1 o 2 horas. Posteriormente, se filtró el extracto metanólico y se evaporó dicho solvente a presión reducida empleando el rotavapor a una temperatura de 50°C, obteniendo así el extracto bruto. A continuación, se procedió a la acidificación del extracto bruto con H_2SO_4 (2% v/v) y a su limpieza utilizando éter etílico con el fin de separar la fase orgánica que contiene materias neutras (clorofilas, ceras, mucílagos) de la fase acuosa, rica en alcaloides. (Acosta, 2013, p.7).

La fase acuosa ácida, se sometió a un proceso de basificación con NH_4OH (10% v/v, pH~9-10) hasta conseguir un pH~10 para la posterior extracción de alcaloides mediante el uso repetido de acetato de etilo, de manera que los alcaloides quedarán retenidos en la fase orgánica. Adicionalmente, se añadió sulfato de sodio anhidro y goma arábiga, para eliminar los restos de agua y se filtró para separar los residuos de sal. Inmediatamente, se procedió a la evaporación del solvente a presión reducida en el rotavapor a una temperatura de 45°C, obteniendo así el extracto purificado.

Finalmente, el extracto purificado se disolvió en un pequeño volumen de metanol, colocando la muestra en un nuevo envase, para su evaporación en una estufa de secado RedLine by Binder, durante 24 horas y posterior conservación a 24 °C y 20% de humedad.

El proceso de extracción de alcaloides de *Crinum x amabile* se realizó de acuerdo al esquema expuesto en la Figura 1-2.

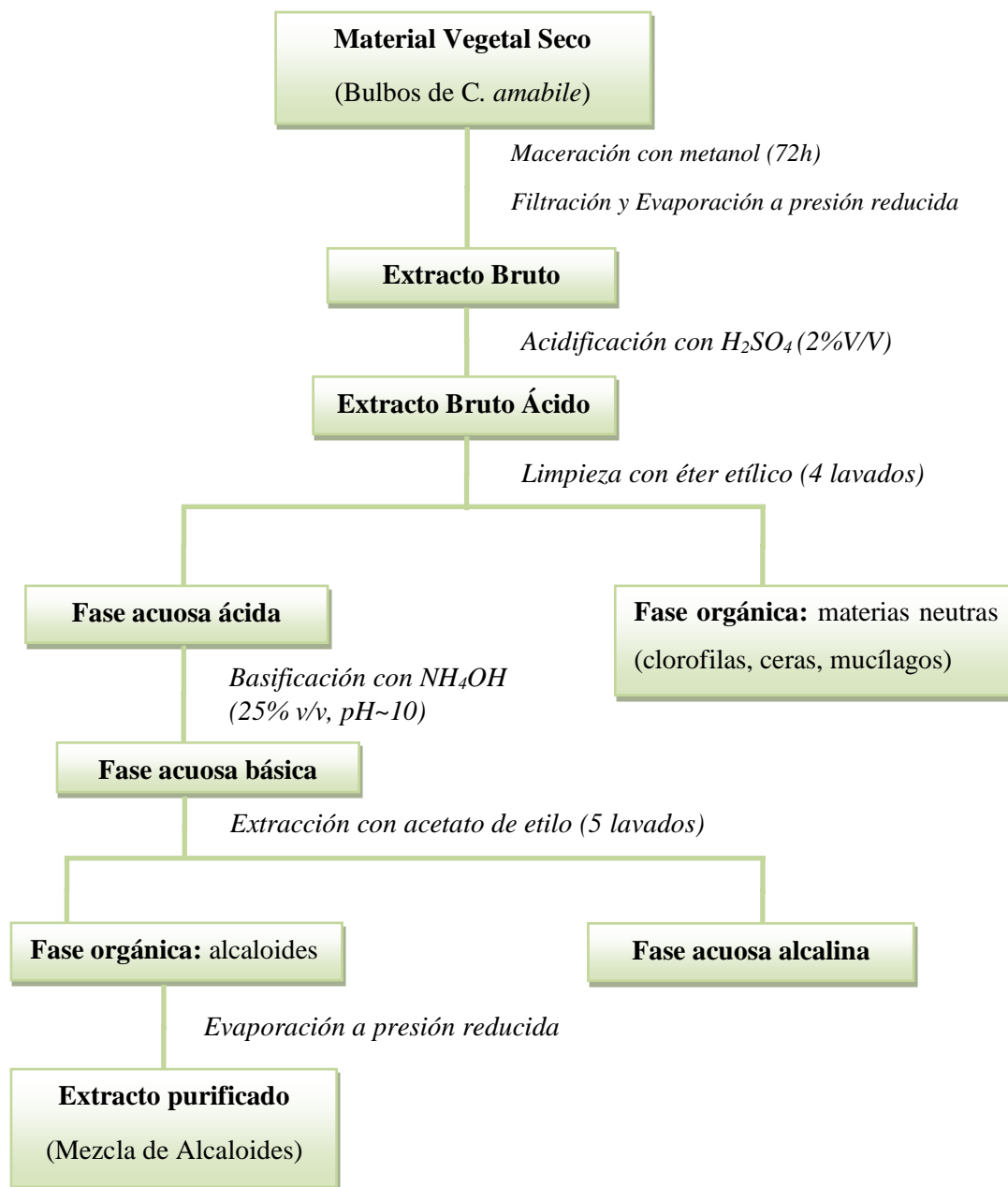


Figura 1-2: Esquema del proceso de extracción de alcaloides del material vegetal de *Crinum x amabile*.

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

Fuente: (Acosta, 2013, p.8).

2.7. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

A partir del extracto de alcaloides disuelto en metanol, se procedió a la realización de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Se empleó el Cromatógrafo de Gases de Agilent, modelo 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (modelo 5975) que opera a 70eV a una temperatura de 230°C en la fuente iónica. El cromatógrafo dispone de una columna SAPIENS-X5-MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), siendo su fase estacionaria la fenilmetilsilicona al 5%.

El programa de temperatura utilizado fue:

- Aumento inicial desde 55 °C a 100 °C (60 °C/min).
- 2 minutos a 100 °C.
- Aumento desde 100 °C a 180 °C (15 °C/min).
- 1 minuto a 180 °C.
- Aumento desde 180 °C a 300 °C (5 °C/min)

Se trabajó a una temperatura de 280 °C en el inyector y el flujo de He fue de 0,8 ml/min y se usó el modo *splitless*. Como alcaloide estándar de referencia para todos los análisis se empleó codeína. En la obtención y el análisis de los datos espectrales se utilizó el *software* AMDIS 2.71 (NIST), el cual permitió verificar la pureza de las señales y el cálculo de índices de retención.

2.8. Preparación de soluciones

2.8.1. Muestras de estudio

En primer lugar, se colocó el nombre, fecha y numeración en los envases para la preparación de las soluciones. El buffer fosfato salino y enzimas, tienen un largo periodo de duración en congelación (aproximadamente 6 meses), pero se controló continuamente la presencia de contaminantes.

Compuesto de referencia (Galantamina)

Se preparó una solución madre de 1 mg de estándar galantamina en 1 mL de PBS, lo que representa una concentración de $3,48 \times 10^{-3}$ M a partir de la cual se realizaron las diluciones necesarias.

Muestras de alcaloides de *Crinum x amabile*

Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/mL para lo cual se pesó en un eppendorf 10 mg del extracto de alcaloides de *C. amabile* y se disolvió con 100 μ L de metanol aplicando agitador vórtex por 10 minutos, posteriormente se añadió 900 μ L de PBS, con la ayuda de un baño ultrasonido se mezcló en 3 sesiones de 10 minutos, se dejó precipitar las partículas para finalmente filtrar a través de una membrana Millipore de 0,45 μ m.

A partir de la solución madre se prepararon 4 diluciones con las siguientes concentraciones:

Tabla 4-2: Diluciones de la muestra de alcaloides de *Crinum x amabile*

DILUCIÓN N°	CONCENTRACIÓN	VOL. SOLUCIÓN (μ L)	VOL. PBS (μ L)	VOL. FINAL (μ L)
1	100 μ g/mL	10 (Sol. Madre)	990	1000
2	50 μ g/mL	500 (Dilución 1)	500	1000
3	10 μ g/mL	200 (Dilución 2)	800	1000
4	1 μ g/mL	100 (Dilución 3)	900	1000

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

2.9. Acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.

La determinación de actividad inhibitoria de colinesterasas de *Crinum x amabile* se realizó bajo la metodología establecida por Ellman et al. (1961), con algunas modificaciones de Ortiz et al. (2016), protocolo actualmente empleado en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería de la

Universidad de San Juan (Argentina). Previo a la obtención de resultados finales, fue necesario adaptar el método a las condiciones experimentales e instrumentales del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo.

2.10. Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa

El ensayo se llevó a cabo en microplaca de acuerdo al método de Ellman et al. (1961, p.88) modificado por Ortiz et al. (2016). Se adicionó 50 μL de AChE o BuChE disueltas en buffer fosfato salino (8 mM K_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.5) y 50 μL de la muestra disuelta en el mismo buffer. Se incubó la placa a 21 °C durante 30 min y se agregó 100 μL de solución sustrato (Na_2HPO_4 0.04 M; DTNB 0.005 M y ATC, BTC 0.03 M, en agua grado farmacéutico, pH 7.5). Luego de 5 min, las absorbancias fueron leídas en un lector de microplacas BioTek ELx800 a 405 nm. La actividad inhibitoria de la enzima se calculó como un porcentaje en comparación con un ensayo empleando un buffer sin ningún inhibidor. Las concentraciones de las muestras evaluadas se expresaron como $\mu\text{g/mL}$ para los extractos y como μM en el caso de compuestos puros. Los valores calculados de IC_{50} cuyo valor se encontró por encima de 200 $\mu\text{g/mL}$ para extractos y por encima de 200 μM para compuestos puros, se consideraron inactivos. Las concentraciones del extracto de alcaloides utilizadas para calcular los valores de IC_{50} fueron 0.2, 0.5, 1, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos de AChE y 10, 20, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ en los ensayos de BuChE. La galantamina, se utilizó como compuesto de referencia.

Las enzimas utilizadas fueron AChE de la anguila eléctrica *Electrophorus electricus*, (C3389) y BuChE de suero equino (C7512), mientras que los sustratos utilizados en cada caso fueron yoduro de acetiltiocolina (A5751) y yoduro de butiriltiocolina (20820). Para generar la reacción de color se utilizó ácido ditionitrobenzoico (DTNB, D-8130), todos adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich.

2.11. Análisis de datos

Se procesaron las absorbancias resultantes en Microsoft Excel para obtener el porcentaje de inhibición, cada medición se repitió tres veces y se aplicó la fórmula:

$$\% I = 100 - \frac{M - B_M}{C - B_C} \times 100$$

Donde:

M: lectura muestra

C: lectura control

BM: lectura blanco muestra

BC: lectura blanco control.

2.11.1. Curva de inhibición para la determinación del IC₅₀

Se obtuvo a partir del gráfico del porcentaje de inhibición, contra la concentración de extracto, posteriormente se agregó la línea de tendencia (logarítmica) y con la ecuación de la misma se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática, en el caso que la línea de tendencia no se adapte correctamente, también se puede realizar por interpolación directa en el gráfico. Los resultados obtenidos de IC₅₀ son medias \pm SD de tres determinaciones individuales cada una por triplicado.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A partir de las metodologías antes mencionadas se presentan los datos experimentales y resultados obtenidos, además del acondicionamiento del método modificado de Ellman et al, del análisis de inhibición enzimática del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.

3.1. Obtención del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*

El método de extracción permitió alcanzar una mayor proporción de estructuras de naturaleza alcaloidea, que pueden variar de acuerdo a la edad, desarrollo y parte utilizada de la planta (Sharapin, 2000, p.39), estos alcaloides son el resultado de una sobreproducción del aminoácido tirosina, componente esencial en la biosíntesis de dichos compuestos, la cual se cree que ocurre en los bulbos, debido a que presentan una cantidad superior de alcaloides que en otras partes de la planta. (Bergoñon, 1994, p.12).

Tabla 1-3: Resultado de la obtención del extracto de alcaloides de *C. amabile*

EXTRACTO	PESO INICIAL	VOLUMEN (MACERACIÓN)	EXTRACTO RICO EN ALCALOIDES	% RENDIMIENTO
Metanólico	16 g de bulbo seco	800 mL	110 mg	0.69 %

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

Una vez obtenido el extracto de alcaloides, los resultados se indican en la Tabla 1-3. El porcentaje de rendimiento fue de 0.69%, mismo que puede modificarse de acuerdo al método utilizado, además factores como la presión y temperatura a la cual se sometieron los extractos para ser concentrados podrían influir significativamente en el proceso.

3.2. Identificación de alcaloides por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Los resultados obtenidos mediante CG-EM del bulbo de *C. amabile* en porcentaje se presentan a continuación en la Tabla 2-3, y son respecto a la mezcla total de compuestos del extracto purificado.

Tabla 2-3: Alcaloides identificados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto purificado del bulbo de *Crinum x amabile*.

ALCALOIDE	Rt	RI	% TOTAL
Galantamina	23.378	2430.3	0.68
Sanguinina	23.806	2458.1	3.35
Bufanisina	23.960	2468.0	6.53
N-dimetilgalantamina	24.110	2477.8	<0.1
Vittatina	24.699	2516.0	3.39
m/z 287	24.815	2523.5	0.87
8-O-dimetilmaritidina	25.135	2544.2	5.41
Anhidrolicorina	25.147	2545.0	<0.1
m/z 315	25.222	2549.8	0.98
3-O-acetilsanguinina	25.358	2558.7	0.58
Caranina	25.427	2563.1	<0.1
Kirkina	25.824	2588.9	0.64
Augustina	26.099	2607.1	2.61
11,12- dihidroanhidrolicorina	26.663	2646.2	1.51
Hemantamina	27.284	2689.3	5.94
Flexinina	27.448	2703.4	0.89

Sternbergina	28.064	2743.6	1.18
Licorina	29.077	2813.6	44.01
Ambelina	29.166	2819.8	0.82
Assoanina	30.229	2893.5	11.63
m/z 280	30.701	2926.2	0.61

Interpretación: RT (Tiempo de retención), RI (Índice de retención), % Total (Porcentaje de abundancia respecto a la mezcla total), m/z (relación masa/carga)

Realizado por: Luciana Tallini, 2017.

Fuente: Universitat de Barcelona

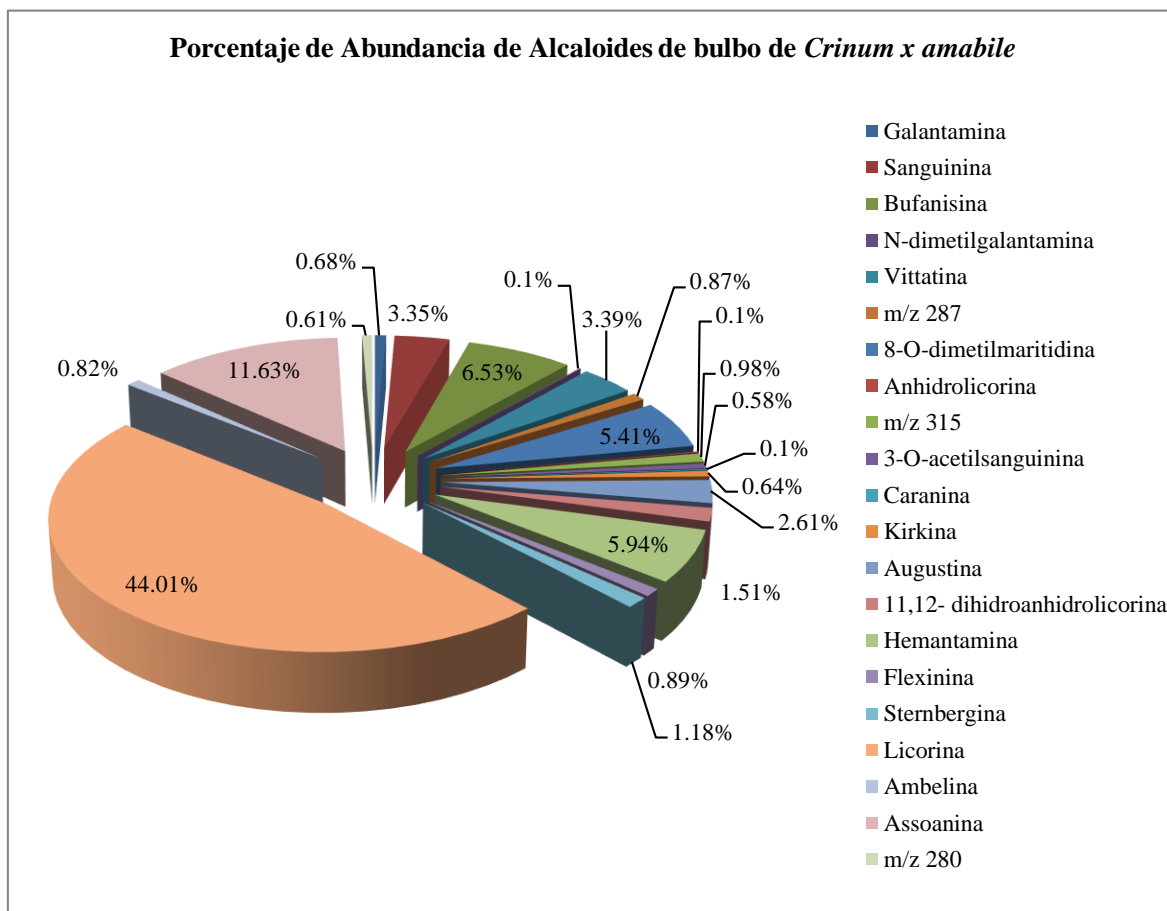


Gráfico 1-3: Porcentaje de abundancia de alcaloides presentes en el extracto purificado de bulbo de *Crinum x amabile*

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017.

Interpretación y análisis

En el análisis del extracto purificado del bulbo de *C. amabile* se ha podido establecer la presencia de 18 alcaloides diferentes, siendo la licorina el más abundante con un porcentaje de 44.01 %, seguido de la assoanina con un 11.63 %. Dentro de los alcaloides con abundancia significativa, alrededor del 6% se encuentran la bufanisina, 8-*O*-dimetilmaritidina y hemantamina.

La licorina, el alcaloide más frecuente y característico de Amaryllidaceae, ha sido reportado como un potente inhibidor de la biosíntesis del ácido ascórbico (Arrigoni et al, 1975, p.513), también ejerce efectos citotóxicos, apoptóticos, antimicóticos, antivirales y antiinflamatorios, siendo un buen candidato para agente terapéutico contra la leucemia (Bastida et al, 2006, p.157). Por otra parte, posee una actividad inhibitoria apreciable frente a la acetilcolinesterasa (Elgorashi et al, 2004), que parece estar asociada con los dos grupos hidroxilos libres, presentes en su estructura. (Houghton et al, 2004).

Entre los alcaloides del tipo licorina, la assoanina se considera el más activo, esto podría explicarse por un anillo aromático C, lo que da a las moléculas una cierta planaridad (López et al, 2002, p.2526). La assoanina presenta además propiedades anticancerígenas y antiprotozoarias. (Tsukano et al, 2014, p.2628).

La bufanisina ha reportado recientemente actividad anticancerígena, al suprimir completamente la invasión celular *in vitro* en concentraciones no tóxicas (Evidente et al, 2011). Por otro lado, el alcaloide hemantamina es un potente inductor de apoptosis (McNulty et al, 2007, p.1071), además estudios previos han demostrado actividades antineoplásicas y antiparasitarias contra *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Trypanosoma cruzi* (Sener et al, 2003, p.1220). En el caso de la 8-*O*-dimetilmaritidina su importancia biológica se debe a que posee un mecanismo de inhibición mixta de la enzima AChE. (Cahlíková et al, 2015, p.1190).

Además, también se detectó una serie de alcaloides en porcentajes minoritarios (<4%) como la sanguinina, augustina, vittatina, 11,12- dihidroanhidrolícorina y sternbergina. De igual manera, se encontraron alcaloides en bajas concentraciones (<1%) como la galantamina, 3-*O*-acetilsanguinina, kirkina, flexinina y ambelina.

La sanguinina tiene una actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa mucho mayor que la galantamina, debido a un grupo hidroxilo adicional disponible para la interacción potencial con la enzima. A su vez, es 10 veces más selectiva que la galantamina para la AChE frente a la BuChE (Farooqui, 2015, p.173). Los alcaloides encontrados también poseen otras propiedades biológicas interesantes en el caso de la vittatina ha demostrado actividad citotóxica (Ortiz et al, 2012, p.13479), la flexinina y augustina, exhiben propiedades inmunoestimulantes, citotóxicas y antipalúdicas. (Bru y Guillou, 2006, p.9043).

La galantamina, aunque presenta una baja concentración en el extracto, es un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa que actúa dentro del sistema nervioso central. Además, estimula los receptores nicotínicos pre y post-sinápticos que, a su vez, pueden aumentar la liberación de neurotransmisores, provocando así directamente la función neuronal. (Sramek et al, 2000). Su doble modo de acción, junto con la evidencia de efectos secundarios reducidos, lo convierten en un candidato prometedor para el tratamiento de enfermedades nerviosas, síndrome de parálisis, esquizofrenia y otras formas de demencia, así como la Enfermedad de Alzheimer. (Bastida et al, 2006, p.161).

Adicionalmente, en el análisis del extracto se mostró una presencia bastante baja de diversos alcaloides, dado que sus abundancias son menores a 0.1% como la *N*-dimetilgalantamina, anhidrolicorina y caranina. Además, cabe destacar que tres compuestos no fueron identificados, el primero con un porcentaje de 0.87% (m/z 287), el segundo con 0.98% (m/z 315), y el tercero con 0.61% (m/z 280).

Los resultados obtenidos de *Crinum x amabile* en el análisis por CG-EM, coinciden con los descritos en el estudio Fitoquímico realizado por Pham et al. (1998, p.371), en el cual la licorina se reporta como el principal alcaloide de esta especie, además de la presencia de bufanisina, augustina, ambelina y flexinina. Por otro lado, se presentan dos nuevos alcaloides crinamabina y 4a-dehidroxicrinamabina, los cuales no se identificaron en la presente investigación.

3.3. Etapas seguidas en el acondicionamiento del método modificado de Ellman et al.

El acondicionamiento del método consistió en pruebas modificando ciertas variables experimentales, este proceso se llevó a cabo de acuerdo a la metodología establecida por Ellman et al. (1961), con modificaciones descritas por Ortiz et al. (2016) y se realizó en tres etapas.

3.3.1. *Etapas 1. Determinación de condiciones de almacenamiento de reactivos y condiciones experimentales.*

En una primera instancia fue necesario determinar y proveer las condiciones idóneas de almacenamiento de cada una de las sustancias y reactivos empleados, para que su actividad no se vea afectada durante el ensayo.

3.3.1.1. *Condiciones de almacenamiento de soluciones, sustratos, enzimas, estándar y muestras*

De acuerdo a las especificaciones de los reactivos utilizados, características del área de trabajo y equipos se establecieron los siguientes parámetros de almacenamiento:

Soluciones

- **Buffer fosfato salino (PBS):** solución conservada en frascos de vidrio ámbar a 4 °C.
- **Solución salina:** solución conservada en frascos de vidrio ámbar a 4 °C.

Estándar

- **Galantamina:** sólido químicamente puro almacenado a menos 20°C.
- **Diluciones de galantamina:** Soluciones conservadas a 4 °C.

Enzimas y sustratos

- **Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa:** enzimas conservadas en eppendorf de 0.5 mL a menos 20°C.
- **Yoduro de acetiltiocolina (ATC) y Yoduro de butiriltiocolina (BTC):** sustratos conservados en eppendorf de 0.5 mL a menos 20 °C.
- **5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB):** sustancia conservada en oscuridad en tubos eppendorf de 1.5 mL a menos 20 °C.

Muestra de alcaloides *Crinum x amabile*

- **Solución madre de alcaloides:** se conserva en eppendorf de 1.5 mL a 4 °C.
- **Diluciones a partir de la solución madre:** conservadas a una temperatura de 4 °C.

3.3.1.2. Condiciones del área de trabajo, equipo y tiempos requeridos

Los requerimientos del ensayo en cuanto a tiempos, características ambientales y equipos fueron las siguientes:

- **Área de trabajo:** Cabina de flujo laminar vertical BIOBASE.
- **Temperatura:** La temperatura en el área de trabajo fue de 21°C, monitoreando no sobrepasar los 24 °C.
- **Presión:** La presión atmosférica del área de trabajo fue de 728.17 hPa.
- **Equipo:** el equipo utilizado fue un Espectrofotómetro de ELISA BioTeK ELx800, de 96 pocillos, se realizó la calibración diaria, cargando el programa con las especificaciones necesarias para la lectura de la microplaca.

- **Tiempo de incubación:** una vez finalizada la adición de la enzima el tiempo de incubación requerido fue de 30 minutos a temperatura ambiente.
- **Tiempo de agitación:** una vez finalizada la adición del sustrato el tiempo requerido de agitación de la microplaca fue de 2 minutos.
- **Tiempo para la lectura:** previo la lectura de la microplaca a 405 nm, la reacción enzima sustrato debe darse en un tiempo exacto de 5 minutos incluida la etapa de agitación

3.3.2. *Etapas 2. Estandarización de la galantamina*

Siendo galantamina el estándar empleado fue necesario realizar múltiples ensayos frente a las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa para que su valor de IC_{50} se estabilice.

3.3.2.1. *Actividad inhibitoria de galantamina sobre acetilcolinesterasa*

En base a parámetros metodológicos, se modificaron progresivamente las variantes de ejecución pipeteo, tiempos de descongelación y preparación de reactivos, uso de cabina de flujo laminar y homogenizado de las muestras. Además, se evaluó la vida útil de la enzima; obteniendo un resultado final de IC_{50} de $1,02 \pm 0,06 \mu M$. Al obtener resultados dentro de los parámetros establecidos por la metodología (Ortiz et al., 2016), en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los datos y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente acetilcolinesterasa.

3.3.2.2. *Actividad inhibitoria de galantamina sobre butirilcolinesterasa*

Se evaluó la capacidad de inhibición de BuChE por parte del estándar galantamina mediante una serie de ensayos, utilizando butiriltiocolina como sustrato. Las variantes de ejecución aplicadas correspondieron a las definidas en el apartado anterior, únicamente se modificó el volumen de dilución de la enzima hasta obtener una actividad enzimática adecuada, dando como resultado un valor IC_{50} de $14,92 \pm 0,55 \mu M$. Al obtener resultados dentro de los parámetros establecidos por la

metodología (Ortiz et al., 2016), en tres ensayos consecutivos, se puede denotar que existe una baja variación entre los datos y por lo tanto se alcanzó el objetivo de estabilizar el compuesto de referencia frente butirilcolinesterasa.

3.3.3. *Etapas 3. Análisis de inhibición enzimática del extracto de alcaloides de Crinum x amabile*

Mediante una detección sistemática se definieron las concentraciones del extracto a utilizar durante los ensayos, de tal manera que al diseñar la curva de inhibición la línea de tendencia se acople adecuadamente y obtener así una ecuación que nos permita calcular el IC₅₀. (Cahlíková et al, 2011, p.577).

3.3.3.1. *Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE del extracto de alcaloides de Crinum x amabile*

La metodología aplicada establece que para este tipo de extractos se debe iniciar realizando un monitoreo de la actividad inhibitoria (López et al. 2002), para lo cual se eligieron 4 concentraciones (1, 10, 50 y 100 µg/mL).

Tabla 3-3: Porcentajes de inhibición de AChE del extracto de *Crinum x amabile*

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de AChE ^a
1	31.202 ± 0.511
10	74.936 ± 0.256
50	87.638 ± 0.148
100	90.878 ± 0.390

^a El resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017

La Tabla 13-3, presenta los porcentajes de inhibición de las 4 concentraciones utilizadas en el monitoreo. Se observó que el extracto inhibió la AChE en más del 90%, las concentraciones de 1 y

50 µg/mL presentaron actividad de 31 y 87%, respectivamente. De esta manera se obtuvieron pautas para la elección de 6 concentraciones que permitan ajustar la curva de regresión para determinar correctamente el IC₅₀. (Álvarez et al, 2008, p.168).

3.3.3.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de BuChE del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*

Se procedió de acuerdo a metodología realizando un monitoreo de la actividad inhibitoria (Ortiz et al., 2016), para lo cual se eligieron 4 concentraciones (1, 10, 50 y 100 µg/mL). Los resultados del porcentaje de inhibición de BuChE se indican en la Tabla 14-3.

Tabla 4-3: Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto de *Crinum x amabile*. Prueba 1

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE ^a
1	0.000
10	2.599 ± 1.159
50	28.412 ± 1.551
100	47.539 ± 0.425

^aEl resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017

Los resultados obtenidos muestran que el extracto inhibió la BuChE en menos del 50%; la concentración de 1 µg/mL no presentó actividad inhibitoria. Por otro lado, la concentración de 100 µg/mL inhibió la enzima tan solo un 47%.

En base a estos datos se procedió a realizar un segundo ensayo con un incremento de las concentraciones (20, 50, 100, 200 µg/mL), para obtener así mayores porcentajes de inhibición. Los resultados se indican en la Tabla 15-3.

Tabla 5-3: Porcentajes de inhibición de BuChE del extracto de *Crinum x amabile*. Prueba 2

Concentración extracto de alcaloides (µg/mL)	Porcentaje de Inhibición de BuChE ^a
20	13.889 ± 0.829
50	30.459 ± 0.287
100	45.594 ± 0.165
200	61.207 ± 0.000

^aEl resultado es la media de tres repeticiones

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017

Una vez realizado el ensayo se puede observar que las concentraciones de 20 y 200 µg/mL presentan un porcentaje de inhibición de 13 % y 61%, respectivamente. Estos datos son importantes para conocer el comportamiento del extracto de alcaloides con respecto a BuChE, y obtener así la ecuación a partir de la cual se calcula el IC₅₀. (Álvarez et al, 2008, p.168).

3.3.4. Inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *C. amabile*

El extracto de alcaloides totales de *Crinum x amabile* se probó para evaluar su actividad inhibitoria de las enzimas AChE y BuChE, usando galantamina como control positivo. Los resultados son expresados en valores de IC₅₀ (µg/mL) que representa la concentración del extracto necesaria para inhibir la acetilcolinesterasa/butirilcolinesterasa en al menos un 50%. (Cortes et al, 2015, p.224).

La concentración del extracto que proporcionó 50% de inhibición (IC₅₀), se obtuvo a partir del gráfico del porcentaje de inhibición, contra la concentración de extracto. Los resultados de inhibición se muestran en la Tabla 16-3, y son la media de tres determinaciones individuales cada una por triplicado.

Tabla 6-3: Inhibición de AChE y BuChE del extracto de alcaloides de *C. amabile*

Extracto de alcaloides	AChE ^a IC ₅₀ µg/mL	BuChE ^a IC ₅₀ µg/MI
<i>Crinum x amabile</i>	2.24 ± 0.01	116.59 ± 2.85
IC ₅₀ Galantamina ^b	0.27 ± 0.03	4.88 ± 0.17

^a El resultado es la media de tres repeticiones; ^b Componente de referencia

Realizado por: Angelo Carrasco, 2017

El extracto de alcaloides totales del bulbo de *C. amabile* presentó una fuerte actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa expresada por su valor IC₅₀ de 2.24 ± 0.01 µg/mL, sin embargo, es menos activo en comparación con el control galantamina (0.27 ± 0.03 µg/mL). En el estudio realizado por Calderón et al. (2010, p.989), se efectuó una exploración de fuentes potenciales de inhibidores de AChE de la familia Amaryllidaceae, en la cual las especies vegetales como: *Crinum x powellii* Hort ex Baker se encuentra como débilmente activa, *Crinum erubescens* Aiton exhibe una actividad moderada, mientras que *Crinum jagus*, *Crinum zeylanicum* y *Crinum x amabile* reportan ser fuertemente activos frente a esta enzima.

Por otra parte, el extracto de alcaloides mostró una capacidad de inhibición débil frente a BuChE, con un valor IC₅₀ de 116.59 ± 2.85 µg/mL, resultado mucho mayor al obtenido por el compuesto de referencia (IC₅₀ 4.88 ± 0.17 µg/mL). No se reportan datos bibliográficos de este tipo de actividad para el género *Crinum*, a pesar de ello la inhibición de BuChE también desempeña un papel importante debido a que posee la capacidad de sustituir temporalmente la AChE inhibida para hidrolizar lentamente la acetilcolina acumulada, aún así sólo un número limitado de alcaloides ha sido probados para su actividad inhibitoria de BuChE hasta el momento. (Walsh et al., 2011, p.1231).

Se han descrito estudios de inhibición de BuChE, por parte de otras especies de la familia Amaryllidaceae, como el realizado por Cahliková et al. (2011, p.577), en donde el extracto de alcaloides de los bulbos de *Zephyranthes grandiflora* presentó una débil inhibición enzimática de BuChE (IC₅₀ 356 ± 9.3 µg/mL). La actividad inhibitoria más potente de butirilcolinesterasa se ha demostrado por

extractos de las especies *Sternbergia lutea* y *Nerine filamentosa* (IC_{50} 3.7 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} 13.0 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$). (Cahlíková et al., 2012, p.571).

Varios alcaloides aislados de diversas especies de Amaryllidaceae han sido estudiados previamente para su actividad inhibitoria *in vitro* de la AChE. Los resultados de estos estudios mostraron que la inhibición de AChE está asociada principalmente con alcaloides tipo galantamina y licorina (López et al, 2002), como el caso de la sanguinina, un inhibidor de la enzima 10 veces más potente que la galantamina; sin embargo, estas estructuras tienen una menor selectividad para la BuChE. (Farooqui, 2015, p.173). Por lo tanto, la presencia de los compuestos anteriormente mencionados podría explicar la actividad inhibitoria de AChE y BuChE del extracto de *Crinum x amabile*.

Como consecuencia, esta especie vegetal puede ser considerada como un posible blanco en la búsqueda de nuevos inhibidores de la AChE/BuChE y podría ser utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES

A través de un protocolo basado en cambios de pH y uso de solventes orgánicos, se logró obtener el extracto bruto de alcaloides totales del bulbo de *Crinum x amabile*, con un rendimiento del 0,69%.

Mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se identificaron un total de 18 alcaloides propios de Amaryllidaceae en el bulbo de *Crinum x amabile*, siendo la licorina el más abundante con un porcentaje de 44,01 %, seguido de la assoanina con un 11,63 %. Además, se determinó la presencia de alcaloides de tipo galantamina.

Se adaptó el método modificado de Ellman et al, para el estudio de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de acuerdo a las características físicas, ambientales y de equipamiento del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Chimborazo.

El extracto de alcaloides de *Crinum x amabile* presentó una actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa pronunciada, con un valor $IC_{50} 2.24 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, cercano al compuesto de referencia galantamina con un $IC_{50} 0.27 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$. Evidenciando una cierta selectividad de los alcaloides del extracto hacia esta enzima, siendo 52 veces superior a la que presenta sobre BuChE con un valor $IC_{50} 116.59 \pm 2.85 \mu\text{g/mL}$.

Mediante la presente investigación, se ha logrado establecer de manera cuantitativa la actividad inhibitoria de AChE y BuChE de la especie vegetal *Crinum x amabile*, que puede ser considerada como un posible blanco en la búsqueda de nuevos inhibidores de AChE y en menor medida de BuChE, con un potencial uso para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

RECOMENDACIONES

Se recomienda futuras investigaciones respecto a la evaluación de la capacidad inhibitoria de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa de los alcaloides individuales que se encuentran en el extracto. Además, considerando la diversidad de propiedades biológicas que poseen, sería interesante realizar estudios farmacológicos de actividad citotóxica, antimicótica, antiviral y antiinflamatoria de la especie vegetal *Crinum x amabile*. Adicionalmente, se sugiere desarrollar un método de callos celulares vegetales, para la obtención de licorina.

Por otro lado, sería recomendable desarrollar un *docking* molecular, para predecir las interacciones de unión y patrones de orientación de los alcaloides presentes en *Crinum x amabile* con el sitio activo de AChE/BuChE.

Es importante que se realicen más estudios sobre la familia Amaryllidaceae presente en el Ecuador, que en futuro pudiesen ser empleadas con fines terapéuticos. Y, de esta manera reafirmar el importante papel que tiene la naturaleza en beneficio del ser humano centrado en estas especies vegetales.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA LEÓN, Karen.** Identificación de los alcaloides de *Stenomesson aurantiacum* (Kunth) Herb. [En línea] (Tesis).(Maestría) Universitat de Barcelona, Barcelona, España. 2013. pp. 1-26. [Consulta: 2017-02-09]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/1541/1/T-SENESCYT-00674.pdf>.
- ALPÍZAR, C; & MORALES, C.** "La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa". *Acta Médica costarricense* [En línea], 2003, (Costa Rica), 45, pp. 50-56. [Consulta: 10 febrero 2017]. ISSN 0001-6012. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43445205>.
- ÁLVAREZ, E.R. et al.** "Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (*Guttiferae*)". *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* [En línea], 2008, (Colombia) 15, pp. 165-172. [Consulta: 9 septiembre 2017]. ISSN 0121-4004. Disponible en: [http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view File/781/673](http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/File/781/673).
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION.** "Alzheimer's disease facts and figures". *Alzheimer's & Dementia* [En línea], 2015, (United States of America) 11(3), pp. 332-384. [Consulta: 11 junio 2017]. ISSN 15525260. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526015000588>.
- ARRIGONI, O.; LISO, R.A.; & CALABRESE, G.** "Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis". *Nature* [En línea], 1975, (Italy) 256(5517), pp. 513-514. [Consulta: 29 agosto 2017]. ISSN 0028-0836. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/256513a0>.
- BAQUERO, M.** *Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2006, pp. 1-56.
- BASTIDA, J; LAVILLA, R; & VILADOMAT, F.** *Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids*. Ámsterdam-Holanda: Scientific, Elsevier, 2006, pp. 87-179.

BASTIDA, J; & VILADOMAT, F. *Alkaloids of Narcissus. Narcissus and Daffodil: the genus Narcissus*. 1ª ed. London-England: Gordon Hanks, 2002, pp. 141-211.

BEARD, C. et al. "The prevalence of dementia is changing over time in Rochester, Minnesota". *Neurology*, vol. 45 (1995), (United State of America) pp. 75-79.

BERGOÑON, Salvador. *Aislamiento y caracterización química de alcaloides del tipo Amaryllidaceae. Producción de galantamina por cultivos «in vitro» de Narcissus confusus* [En línea] (Tesis).(Maestría) Universidad de Barcelona-España. 1994. [Consulta: 2017-02-11]. Disponible en: http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2629/01.SBF_1de2.pdf?sequence=1.

BERKOV, S. et al. "Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts". *Phytochemical Analysis* [En línea], 2008, (España) 19(5), pp. 411-419. [Consulta: 5 septiembre 2017]. ISSN 09580344. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.1066>.

BORES, G. et al. "Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine". *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 277, (1996), pp. 728-738.

BRU, C.; & GUILLOU, C. "Total syntheses of crinine and related alkaloids". *Tetrahedron* [En línea], 2006, (France) 62(38), pp. 9043-9048. [Consulta: 31 agosto 2017]. ISSN 00404020. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402006010891>.

CAHLÍKOVÁ, L. et al. "Alkaloids from some amaryllidaceae species and their cholinesterase activity". *Natural Product Communications* [En línea], 2012, (Czech Republic) 7(5), pp. 571-574. [Consulta: 27 septiembre 2017]. ISSN 1934578X. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861493826&partnerID=tZOtx3y1>.

CAHLÍKOVÁ, L. et al. "In Vitro Inhibitory Effects of 8-O-Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier". *Journal of Natural Products* [En línea], 2015, (Spain) 78(6), pp. 1189-1192. [Consulta: 31 agosto 2017]. ISSN 0163-3864. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jnatprod.5b00191>.

CAHLÍKOVÁ, L. et al. "Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by

GC/MS and their cholinesterase activity". *Revista Brasileira de Farmacognosia* [En línea], 2011, (Brazil). 21(4), pp. 575-580. [Consulta: 8 septiembre 2017]. ISSN 1981-528X. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2011000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

CALDERÓN, A.I. et al. "Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors". *Pharmaceutical Biology* [En línea], 2010, (Panama) 48(9), pp. 988-993. [Consulta: 11 septiembre 2017]. ISSN 1388-0209. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731549>.

CASTELLANOS, Fabio. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura-actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano [En línea] (Tesis).(Maestría) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2014. pp. 1-92 [Consulta: 2017-02-09]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39404/1/FabioAndresCastellanosC.2014.pdf>.

COCHO DE JUAN, José Angel. Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos [En línea] (Tesis).(Maestría) Universidad de Santiago de Compostela, España. 2007. p. 1-253 [Consulta: 2017-07-08]. Disponible en: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2383/9788497509749_content.pdf?sequence=1.

CORTES, N. et al. "Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [En línea], 2015, (Colombia) 102, pp. 222-228. [Consulta: 8 septiembre 2017]. ISSN 07317085. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514004695>.

CORTES, N. et al. "Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study". *Life Sciences* [En línea], 2015, (Colombia) 122, pp. 42-50. ISSN 00243205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.011>.

CRAIG, L.A.; HONG, N.S.; & MCDONALD, R.J. "Revisiting the cholinergic hypothesis in the

development of Alzheimer's disease". *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [En línea], 2011, (Canada) 35(6), pp. 1397-1409. [Consulta: 14 septiembre 2017]. ISSN 01497634. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763411000443>.

DAVIES, P. "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's Disease". *The Lancet* [En línea], 1976, (Scotland) 308(8000), pp. 1403-7. [Consulta: 13 junio 2017]. ISSN 01406736. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067367691936X>.

DE LA TORRE, L; NAVARRETE, H; MURIEL M; MACÍA, M; & BALSLEV, H. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito-Ecuador, 2008, p. 1-949.

ECUADOR, ASAMBLEA NACIONAL. *En Ecuador más de 100 mil personas sufren de alzheimer y otras demencias*. [En línea], 2014. [Consulta: 10 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.asambleanacional.gob.ec/es/noticia/en-ecuador-mas-de-100-mil-personas-sufren-de-alzheimer-y>.

ECUADOR, MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. "Prioridades de investigación en salud, 2013-2017". *Coordinación General de Desarrollo Estratégico en Salud Dirección de Inteligencia de la Salud* [En línea], 2013, pp. 1-37. [Consulta: 12 junio 2017]. Disponible en: [https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/PRIORIDADES_INVESTGACION_SALUD2013-2017\(1\).pdf](https://www.ucuenca.edu.ec/images/facu_medicina/Investigacion/PRIORIDADES_INVESTGACION_SALUD2013-2017(1).pdf).

ECUADOR, SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO. *Plan Nacional Buen Vivir* [En línea]. Quito: 2013. ISBN 978-9942-07-448-5. Disponible en: www.planificacion.gob.ec%5Cnsemplades@semplades.gob.ec%5Cnwww.buenvivir.gob.ec%5Cnwww.buenvivir.gob.ec.

ELGORASHI, E; STAFFORD, G; & VAN STADEN, J. "Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids". *Planta Med*, vol. 70, (2004), pp. 224-231.

ELLMAN, G. et al. "A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity".

Biochemical Pharmacology [En línea], 1961, (United State of America) 7(2), pp. 88-95. [Consulta: 13 febrero 2017]. ISSN 00062952. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>.

EVIDENTE, A. et al. "Biological Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and their Synthetic Derivatives: Discovery of Novel Leads for Anticancer Drug Design". *Planta Med* [En línea], 2011, (United State of America) 75, pp. 1-16. [Consulta: 30 agosto 2017]. ISSN 0032-0943. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3125136/pdf/nihms305522.pdf>.

FAN-CHIANG, T; WANG, H; & HSIEH, J. "Synthesis of phenanthridine skeletal Amaryllidaceae alkaloids". *Tetrahedron* [En línea], 2016, (China) 72(36), pp. 5640-5645. [Consulta: 30 agosto 2017]. ISSN 14645416. DOI 10.1016/j.tet.2016.07.065. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402016307232>.

FAROOQUI, T; & FAROOQUI, A. *Neuroprotective effects of phytochemicals in neurological disorders*. Ohio-USA, 2015, pp. 1-634.

FENNELL, C.W; & VAN STADEN, J. "Crinum species in traditional and modern medicine". *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 78, n° 1 (2001), (South Africa), pp. 15-26. ISSN 03788741.

FRANCIS, P; RAMÍREZ, M; & MITCHELL, K. "Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease". *Neuropharmacology* [En línea], 2010, (Singapore) 59, pp. 221-229. [Consulta: 30 agosto 2017]. ISSN 0028-3908. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390810000432>

GARCÍA, A; & GANDÍA L. *Fronteras en la Enfermedad de Alzheimer* [En línea]. Madrid-España: Universidad Autónoma de Madrid, 2012. [Consulta: 14 junio 2017]. Disponible en: http://www.farmaindustria.es/idc/groups/public/documents/publicaciones/farma_1049.pdf.

GREIG, N. et al. "Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy". *Int Psychogeriatr* [En línea], 2002, (England) 14, pp. 77-91. [Consulta: 30 agosto 2017]. ISSN

1041-6102. Disponible en: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1041610203008676

HOUGHTON, J; AGBEDAHUNSI, M; & ADEGBULUGBE, A. "Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species". *Phytochemistry* [En línea], 2004, (England) 65, pp. 2893-2896. [Consulta: 30 agosto 2017]. ISSN 00319422. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942204004017>

ITO, K. et al. "Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease". *Alzheimer's & Dementia* [en línea], 2010, (United States of America) 6, pp. 39-53. [Consulta: 4 junio 2017]. ISSN 15525260. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526009020135>

KONRATH, E. et al. "Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, n° 12 (2013), (Brazil) pp. 1701-1725. ISSN 00223573.

LÓPEZ, S. et al. "Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts". *Life Sciences*, vol. 71, n° 21 (2002), (Spain) pp. 2521-2529. ISSN 00243205.

MCNULTY, J. et al. "Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids". *Phytochemistry*, vol. 68, n° 7 (2007), (Spain) pp. 1068-1074. ISSN 00319422.

MEEROW, A; & SNIJMAN, D. "Amaryllidaceae. Kubitzki, K. The families and genera of vascular plants. Flowering plants monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae)". *Springer-Verlag*, vol. 3 (1998), pp. 83-110.

MEEROW, A., JOST, L. y OLEAS, N. "Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae)". *PhytoKeys* [En línea], 2015, (Ecuador), 48(48), pp. 1-9. [Consulta: 10 octubre 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25931969>.

MINGA, D. et al. "A new species of *Phaedranassa* (Amaryllidaceae) from Ecuador". *Phytotaxa* [En línea], 2015, (Ecuador) 192(1), pp. 50-53. [Consulta: 4 junio 2017]. ISSN 1179-3155.

Disponible en: <http://biotaxa.org/Phytotaxa/article/view/phytotaxa.192.1.6>

NAIR, J. et al. "Alkaloids From *Crinum Delagoense*". *Phytochemistry*, vol. 49, n° 8 (1998), (Spain) pp. 2539-2543.

NATIONAL INSTITUTE ON AGING. *La enfermedad de Alzheimer*. [En línea]. 2016. [Consulta: 10 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.nia.nih.gov/espanol/publicaciones/guia-quienes-cuidan-personas-alzheimer>.

OLGUÍN, L; & RODRÍGUEZ, H. *Cromatografía de Gases*. [En línea]. México: 2004 [Consulta: 8 julio 2017]. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Enfermedad de Alzheimer en América. [En línea]. 2016. [Consulta: 9 febrero 2017]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11322&Itemid=41586&lang=es.

ORHAN, I. et al. "In vitro Anticholinesterase Activity of Various Alkaloids". *Z. Naturforsch* [En línea], 2007, (Turkey) 62, pp. 684-688. [Consulta: 5 septiembre 2017]. ISSN 1865-7125. Disponible en: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/znc.2007.62.issue-9-10/znc-2007-9-1010/znc2007 9-1010.pdf>.

ORTIZ, J. et al. "Wild Argentinian Amaryllidaceae, a New Renewable Source of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galanthamine and Other Alkaloids". *Molecules* [En línea], 2012, (Argentina) 17(12), pp. 13473-13482. [Consulta: 6 junio 2017]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/11/13473/>.

ORTIZ, J. et al. "Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and Their Cholinesterase-Inhibitory Activities: An in Vitro and in Silico Study". *Journal of Natural Products*, vol. 79, n° 5 (2016), (Argentina) pp. 1241-1248. ISSN 15206025.

OSORIO, Edison. Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno*

(Clusiaceae) [En línea] (Tesis).(Maestría) Universidad de Barcelona, España. 2008. pp. 1-175. [Consulta: 18 junio 2017]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/42675/1/EJOD_TESIS.pdf.

OTERO, J. y SCHEITLER, L. "Las fronteras entre el envejecimiento cognitivo normal y la enfermedad de Alzheimer. El concepto de deterioro cognitivo leve". *Revista Médica del Uruguay* [En línea], 2003, (Uruguay) 19(1), pp. 4-13. [Consulta: 23 junio 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/rmu/v19n1/v19n1a02.pdf>

PAULO DE ANDRADE, Jean. Estudio de la composición alcaloídica de *Narcissus broussonetii* y de tres especies brasileñas del género *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) [En línea] (Tesis).(Doctorado) Universidad de Barcelona, España. 2014. pp. 1-171. [Consulta: 17 junio 2017]. Disponible en: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/55988/1/JPdA_TESIS.pdf.

PHAM, L. et al. "Alkaloids from *Crinum amabile*". *Phytochemistry*, vol. 48, n° 2 (1998), (Germany) pp. 371-376. ISSN 00319422.

POHANKA, M.. "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology". *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* [En línea], 2011, (Czech Republic) 155(10), pp. 219-230. [Consulta: 25 junio 2017]. Disponible en: <http://biomed.papers.upol.cz/pdfs/bio/2011/03/02.pdf>

RESTREPO, L. "La Enfermedad de Alzheimer Familiar". *Neuropsicología, Neuropsiquiatría y Neurociencias* [En línea], 2012, (Colombia) 12(1), pp. 63-73. Disponible en: <http://itmojs.itm.edu.co/index.php/desdelabiblioteca/article/view/915/833>.

ROMANO, M. et al. "Enfermedad de Alzheimer". *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina* [En línea], 2007, 175, pp. 9-12. [Consulta: 24 junio 2017]. Disponible en: http://congreso.med.unne.edu.ar/revista/revista175/3_175.pdf.

SÁNCHEZ, J. et al. "Alteración de la actividad de la butirilcolinesterasa en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con inhibidores de la acetilcolinesterasa". *Neurología* [En

línea], 2011, (España) 26(4), pp. 247-248. [Consulta: 25 junio 2017]. ISSN 21735808. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173580811700517>.

SATHEESHKUMAR, N. et al. "Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents". *Phytomedicine* [En línea], 2010, (India) 17(3-4), pp. 292-295. [Consulta: 4 septiembre 2017]. ISSN 09447113. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711309001603>.

SCHLIEBS, R. y ARENDT, T. "The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease". *J Neural Transm*, vol. 113, n° 11 (2006), (Germany) pp. 1625-1644.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. "Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats". *Pharmacy and Pharmacology Communications*, vol. 6, n° 7 (2000), (Spain) pp. 309-312.

SENER, B; ORHAN, I; y SATAYAVIVAD, J. "Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae". *Phytotherapy Research*, vol. 17, n° 10 (2003), (Turkey) pp. 1220-1223.

SHARAPIN, N. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello, 2000, pp. 1-247.

SRAMEK, J; FRACKIEWICZ, E; y CUTLER, N. "Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine". *Expert Opin Investig Drugs* [En línea], 2000, (United State of America) 9(10), pp. 2393-2402. [Consulta: 13 junio 2017]. ISSN 1354-3784. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.9.10.2393>

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. "*Daffodils* as Potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity". *Industrial Crops and Products*, vol. 43, n° 1 (2013), pp. 237-244. ISSN 09266690.

TSUKANO, C. et al. "Synthesis of Pyrrolophenanthridine Alkaloids Based on C(sp³)-H and C(sp²)-H Functionalization Reactions". *Chemistry - An Asian Journal* [En línea], 2014, (Japan) 9(9), pp. 2628-2634. [Consulta: 26 septiembre 2017]. Disponible en:

<http://doi.wiley.com/10.1002/asia.201402490>.

VIEGAS, C. et al. "New Anti-Alzheimer Drugs from Biodiversity: The Role of the Natural Acetylcholinesterase Inhibitors". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [En línea], 2005, (Brazil) 5(10), pp. 915-926. [Consulta: 13 junio 2017]. ISSN 13895575. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=13895575&volume=5&issue=10&spage=915>.

VILLAR, A; MOLINUEVO, J; y GÓMEZ, T. "Enfermedad de Alzheimer". *Unidad de Enfermedades Neurodegenerativas, sección Memoria-Alzheimer. Institut Clínic Malalties Sistema Nerviós* [En línea], 2004, (España) 67(1537), pp. 28-32. [Consulta: 24 junio 2017]. Disponible en: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/67/1537/28/1v67n1537a13067850pdf001.pdf>.

WALSH, R. et al. "Synergistic inhibition of butyrylcholinesterase by galantamine and citalopram". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [En línea], 2011, (Canada) 1810(12), pp. 1230-1235. [Consulta: 12 septiembre 2017]. DOI 10.1016/j.bbagen.2011.08.010. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511002078>.

ANEXOS

ANEXO A: Recolección del material vegetal, *Crinum x amabile*.



Especie vegetal *Crinum x amabile* recolectada en la playa de Muisne-Esmeraldas

ANEXO B: Acondicionamiento del material vegetal.



Cortado de los bulbos de *C. amabile*

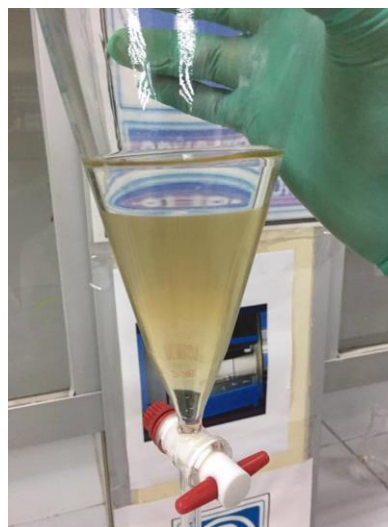


Molino de cuchilla giratoria Arthur
H. Thomas C.O

ANEXO C: Obtención del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.

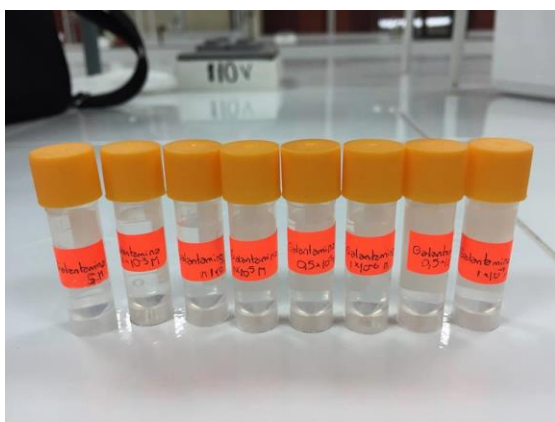


Maceración de los bulbos secos y triturados en metanol



Extracción de alcaloides con acetato de etilo

ANEXO D: Ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *Crinum x amabile*.



Soluciones del estándar galantamina



Muestras de alcaloides de *C. amabile*



Lectura de la microplaca en el espectrofotómetro ELISA BioTek ELx800

ANEXO E: Curvas de inhibición de acetilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *C. amabile*, para la obtención del IC₅₀. (GRÁFICO 1E, GRÁFICO 2E, GRÁFICO 3E).

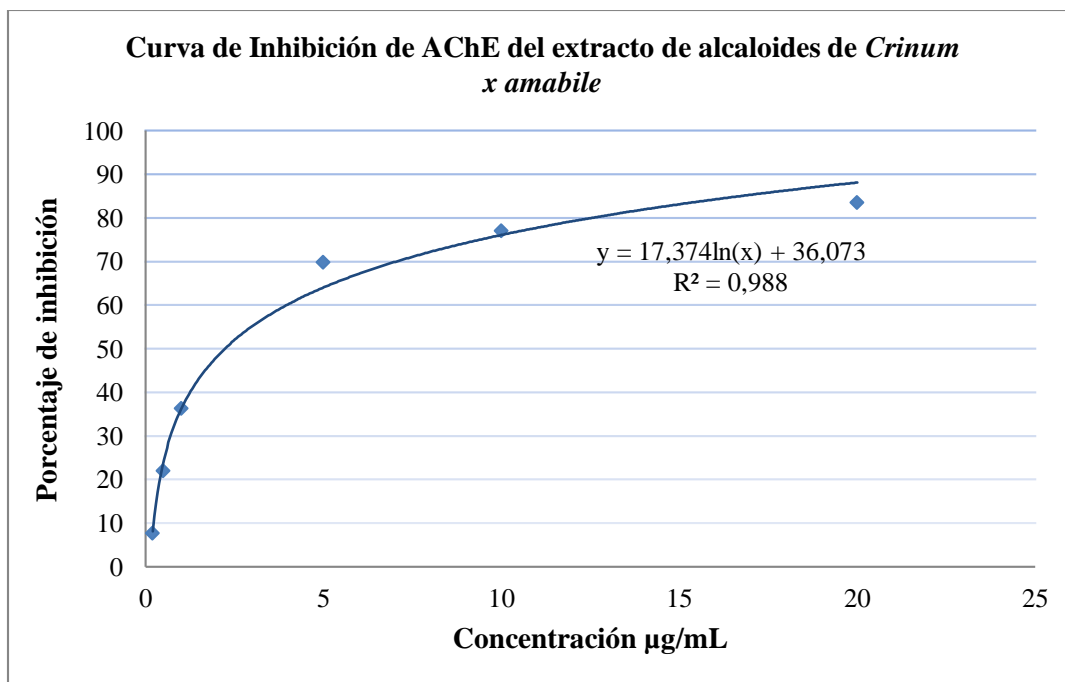


Gráfico 1E. Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Primera repetición

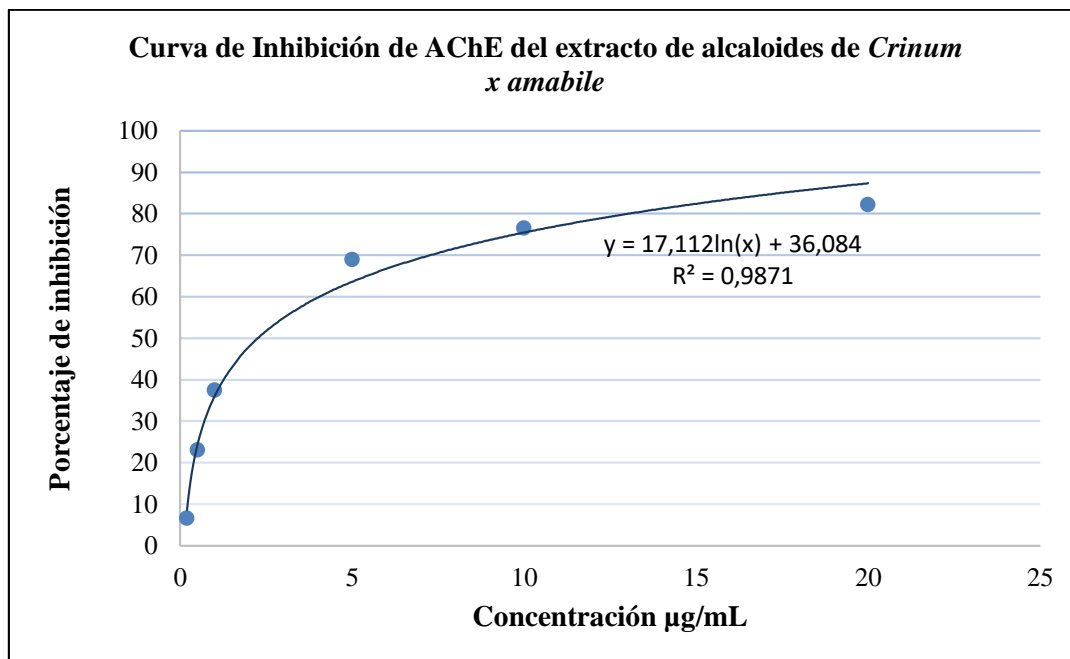


Gráfico 2E. Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Segunda repetición

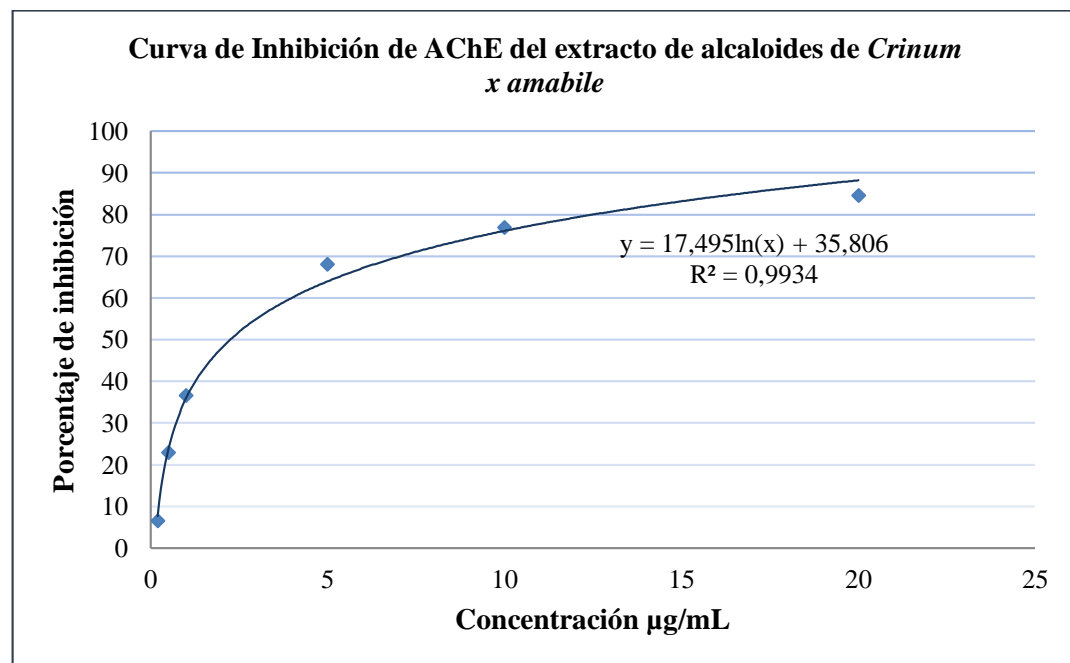


Gráfico 3E. Ensayo de inhibición de AChE del extracto de alcaloides. Tercera repetición

ANEXO F: Curvas de inhibición de butirilcolinesterasa del extracto de alcaloides de *C. amabile*, para la obtención del IC₅₀. (GRÁFICO 1F, GRÁFICO 2F, GRÁFICO 3F).

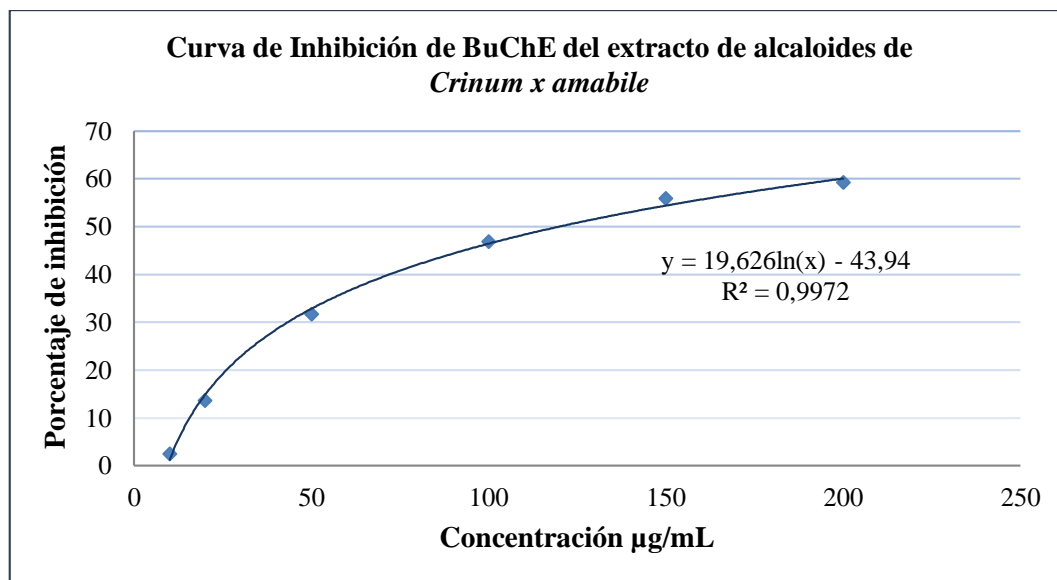


Gráfico 1G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Primera repetición

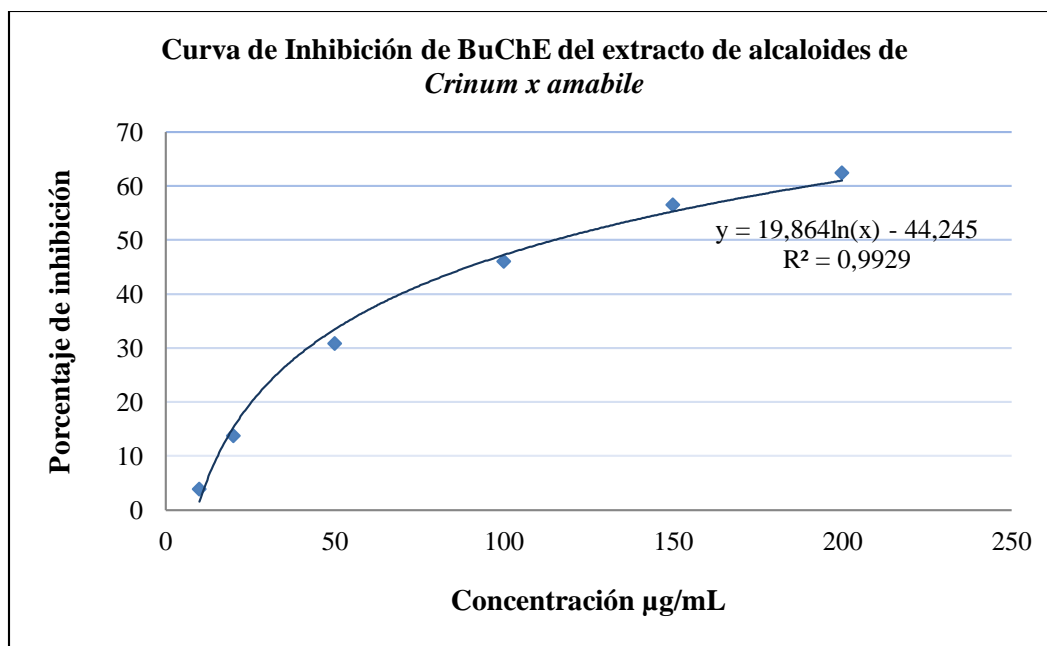


Gráfico 2G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Segundo repetición

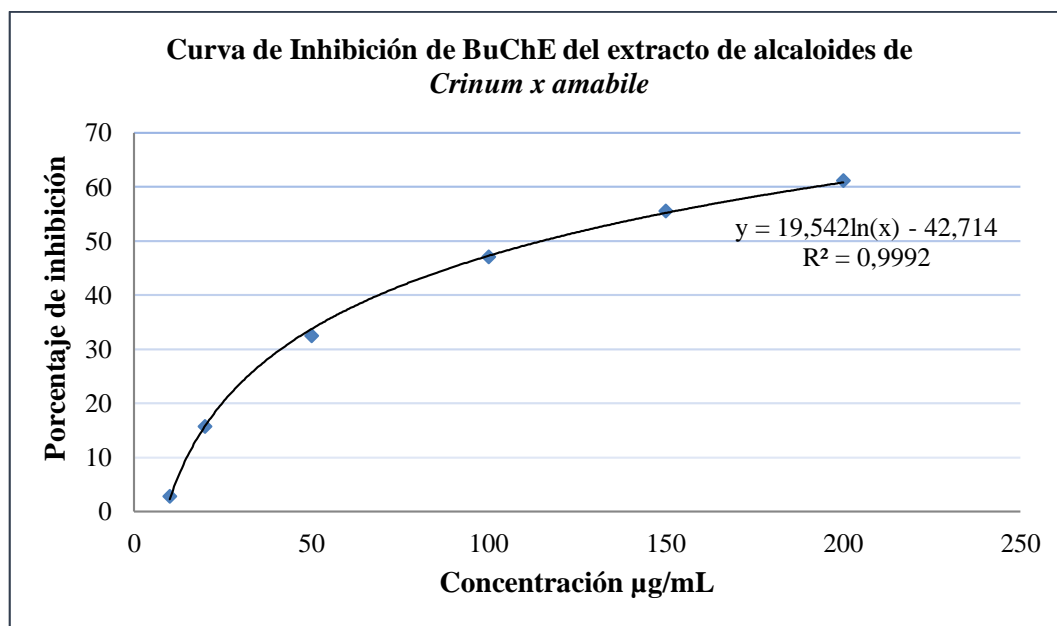


Gráfico 3G. Ensayo de inhibición de BuChE del extracto de alcaloides. Tercera repetición